



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학석사 학위논문

조직의 연속 단면으로 만드는
미세조직 구역화와 3차원 재구성
방법 개발: 사람 시상하부 3차원
교육 모델

Development of Microstructural
Segmentation and 3D Reconstruction Method
Using Serial Section of Tissue: 3D
Educational Model of Human Hypothalamus

2019년 8월

서울대학교 대학원
의학과 해부학전공
김 선 주

Development of Microstructural
Segmentation and 3D
Reconstruction Method Using
Serial Section of Tissue: 3D
Educational Model of Human
Hypothalamus

조직의 연속 단면으로 만드는
미세조직 구역화와 3차원 재구성 방법
개발: 사람 시상하부 3차원 교육 모델

August, 2019

Department of Anatomy & Cell Biology
Graduate School of Medicine
Seoul National University
Sun Joo Kim

조직의 연속 단면으로 만드는 미세조직 구역화와 3차원 재구성 방법 개발: 사람 시상하부 3차원 교육 모델

지도교수 황 영 일

이 논문을 의학석사 학위논문으로 제출함

2019년 8월

서울대학교 대학원
의학과 해부학전공
김 선 주

김선주의 의학석사 학위논문을 인준함

2019년 8월

위 원 장 유 성 호 (인)

부위원장 황 영 일 (인)

위 원 최 형 진 (인)

Development of Microstructural Segmentation and 3D Reconstruction Method Using Serial Section of Tissue: 3D Educational Model of Human Hypothalamus

by
Sun Joo Kim

A thesis submitted to the Department of
Anatomy & Cell Biology in partial fulfilment of
the requirements for Master Degree in
Medicine at Seoul National University College
of Medicine

August, 2019

Approved by Thesis committee:

Professor _____	Chairman
Professor _____	Vice Chairman
Professor _____	

초 록

서론: 조직 염색 영상의 3차원 재구성 기술은 MRI와 CT가 제공하지 못하는 미세구조를 시각화 하여 3차원 조직학에 활용된다는 점에서 가치가 있다. 조직 3차원 재구성에는 각 단계에 적합한 기기와 소프트웨어가 사용된다. 그러나 고가의 기기와 소프트웨어를 전부 갖추기란 쉽지 않으므로 기존의 연구는 제한적인 소수에 의해 이루어져 왔다. 사람 시상하부는 다른 뇌 구조물에 비해 상대적으로 크기는 작지만 항상성 조절의 중추이며 생존과 직결된 신체 활동을 조절하는 중요한 기관이다. 기존 시상하부에 대한 시각적 연구는 조직학 영상 기반의 2차원 지도 중심으로 이루어져 구조를 공간지각적으로 이해하는데 많은 어려움이 있었다. 또한 현재 발표된 대부분의 사람 시상하부 3차원 지도는 MRI 데이터를 기반으로 작성되어 있어 신경핵 단위의 미세구조 정보를 충분히 전달하지 못한다. 따라서 본 연구에서는 두가지 목표를 달성하고자 하였다. 첫째로, 접근성이 좋은 장비와 소프트웨어를 활용하여 보다 넓은 범위의 연구자들이 수행할 수 있는 조직의 3차원 재구성 방법을 개발하고자 하였다. 둘째로, 위의 과정을 통해 확립한 방법을 시상하부에 적용하여 해당 분야 연구자들이 학습 및 교육에 활용할 수 있는 3차원 모델을 제작하고자 하였다.

연구 대상 및 방법: 사람 시상하부 전체와 시각로가 포함된 조직을 대상으로 조직 3차원 재구성을 시도하였다. 염색된 각 조직절편을 슬라이드 스캐너를 이용해 디지털 영상으로 변환하였고 ZEN을

사용하여 해상도 조절과 확장자 변환을 시행하였다. 전체 영상을 Adobe Photoshop을 이용하여 시각로와 미세혈관, 안쪽후각겉질의 외곽선을 기준으로 정합 하였다. 이 후 미세조직 구역화, 소실된 슬라이드 영상의 수동 보간법 적용, 전체 구역화 영상의 흑백 변환, 마스크 제작, 구조물 별 분류를 시행하였다. 또한 전체 영상을 ImageJ를 사용하여 bit수 교정 및 확장자 변환을 수행하였다. 이 후 MEDIP에서 구역화 한 구조물 영상의 3차원 재구성, STL 확장자 변환 및 내보내기를 시행하였다. 이 후 MeshMixer를 사용하여 표면의 요철과 이상점을 교정한 뒤 WebGL 교육모델로 제작하였다. 이렇게 수립된 protocol을 사람 시상하부에 적용하여 내부 신경핵과 미세구조를 3차원으로 재구성하였다.

결과: Zen, Adobe Photoshop, ImageJ를 사용하여 조직 염색 영상, 시각로 2차원 지도, 색면 레이어, 패스영역 레이어, 흑백변환 영상, 흑백 반전 영상, Raw data mask를 생성하였다. 이 후 MEDIP과 Meshmixer를 사용하여 전체조직과 시각로 부피모델, 표면모델, 교육모델을 생성하였다. 이를 사람 시상하부 미세구조의 시각화에 적용하여 조직 염색 영상, 2차원 지도, 미세구조와 신경핵 구역화 색면 레이어, 패스영역 레이어, 흑백 변환 영상, 흑백 반전 영상, 3차원 Raw data mask, 3차원 재구성 부피 모델, 표면 모델, 3차원 교육모델을 생성하였다.

고찰: 본 연구에서는 Zen, Adobe Photoshop, ImageJ, MEDIP, Meshmixer로 이어지는 조직의 3차원 재구성 제작 protocol을 개발하였다. 본 연구는 기존의 3차원 재구성 방법론과 비교했을 때

외곽선이 뚜렷하지 않은 구조물의 영상 위에 수동으로 구역화를 수행했다는 점에서 차별성이 있다. 또한 기존의 조직 3차원 재구성 방법론과 비교했을 때 각 단계에 사용되는 고가의 소프트웨어와 기기를 여러 개의 접근성이 높은 소프트웨어로 분할 및 적용했다는 점에서 기존 연구와 다르다. 본 연구의 2차원 지도는 Allen atlas가 제공하는 사람 뇌 2차원 지도와 비교했을 때 보다 촘촘한 100 μm 의 영상을 일정한 간격으로 획득했다는 점에서 차별성이 있다. 또한 MRI 기반 3차원 재구성 모델이 제공하지 못하는 여러 미세구조와 신경핵을 시각화했다는 점에서 가치가 있다. 기존의 2차원 신경해부학 교육자료와 비교했을 때 본 연구에서 제작한 3차원 교육모델은 구조물들의 위치관계를 공간지각적으로 보다 쉽게 파악할 수 있다는 장점이 있다. 또한 본 연구의 결과물은 기존의 3차원 신경해부학 교육자료와 달리 실험을 통해 얻은 실물 자료를 기반으로 제작되었다는 점에서 가치가 있다.

결론: 본 연구에서는 사람 시상하부 조직을 매개로 조직의 3차원 재구성 protocol을 확립하였다. 이를 통해 사람 시상하부 내부의 미세구조와 신경핵의 위치관계를 공간지각적으로 파악할 수 있는 부피모델과 표면모델을 생성할 수 있었다. 이 결과물들은 의료인 교육에 적합한 교육모델로 변환하여 공개 자료로 제공되었다.

주요어: 3차원 재구성, 사람 시상하부, 2차원 지도, 구역화, 조직 염색

학 번: 2016-21894

목 차

초 록	i
목 차	iv
표 목록	v
그림 목록	vi
 서 론	 9
 본 론	 15
Chapter 1. 조직의 3차원 재구성 제작 protocol 개발	15
Chapter 2. 사람 시상하부 조직의 3차원 재구성	52
 결 론.....	 95
 참고문헌.....	 96
 Abstract	 101

표 목 록

[표 1] 구역화 한 구조물들의 명칭.....	69
---------------------------	----

그림 목록

[그림 1] 전체 과정 공정도	21
[그림 2] ZEN2.3lite 오픈소스뷰어 소프트웨어를 이용한 스캔 이 미지 영상처리	26
[그림 3] Photoshop 해상도 조정 후 번호 순 정리 된 조직 염색 슬라이드 영상들	26
[그림 4] Photoshop에서 Warp 툴을 이용하여 왜곡 교정 및 정합 하는 과정	27
[그림 5] Photoshop 정합 과정의 기준점이 되는 미세혈관과 조직 외곽선 확대도	27
[그림 6] Photoshop을 사용하여 제작한 시각로의 구역화 2차원지 도.....	30
[그림 7] Photohop에서 흑백 변환한 조직 슬라이드 영상	35
[그림 8] Photoshop에서 흑백 변환과 내보내기 후 폴더에 정리한 조직 영상들	36
[그림 9] ImageJ에서 흑백 반전 및 크기 재설정을 수행한 조직 영상	37
[그림 10] MEDIP 소프트웨어로 전체 조직 영상을 불러온 모습	39
[그림 11] MEDIP 소프트웨어로 시각로 Raw data mask를 불러오 기 하여 3차원 재구성 한 모습	39
[그림 12] MEDIP 소프트웨어를 이용한 시각로 3차원 재구성	

모델	40
[그림 13] MeshMixer를 사용하여 제작한 시각로 3차원 교육	
모델.....	43
[그림 14] 완성된 시상하부 전체조직과 3차원 재구성 WebGL 교	
육 모델	44
[그림 15] 전체 과정 공정도	58
[그림 16] Photoshop에서 해상도 조정 후 번호 순 정리 된 조직	
염색 슬라이드 영상	63
[그림 17] Photoshop에서 Warp 툴을 이용하여 정합하는 과정 ..	
.....	64
[그림 18] Photoshop에서 미세혈관과 조직 가장자리를 기준점으	
로 정합하는 과정	64
[그림 19-1] Photoshop을 이용하여 제작한 사람 시상하부 2차원	
구역화 지도	67
[그림 19-2] Photoshop을 이용하여 제작한 사람 시상하부 2차원	
구역화 지도	68
[그림 20] Photoshop을 이용하여 제작한 사람 시상하부 2차원 구	
역화 지도	71
[그림 21] Photoshop의 Path 툴을 이용한 수동 보간법 제작 과정	
.....	73
[그림 22] Photohop에서 흑백 전환 후 내보내기 한 조직 영상들	
.....	74
[그림 23] Photoshop에서 흑백 변환한 조직과 구조물 영상.....	76

[그림 24] ImageJ에서 흑백 반전, 크기 재설정, 확장자 변환하여 폴더안에 저장한 시각로 영상들	78
[그림 25] MEDIP 소프트웨어로 불러오기 한 전체 조직 영상	78
[그림 26] MEDIP 소프트웨어로 재구성 한 미세구조물 3차원 재 구성 부피모델	79
[그림 27] MEDIP 소프트웨어를 이용한 시상하부와 안쪽후각겉질 분리 과정	80
[그림 28-1] MeshMixer를 이용하여 제작한 사람 시상하부 구조 물 3차원 교육 모델	83
[그림 28-2] MeshMixer를 이용하여 제작한 사람 시상하부 구조 물 3차원 교육 모델	84
[그림 29] 완성된 시상하부 3차원 재구성 WebGL 교육 모델	85
[그림 30] 본 연구 뇌 조직과 Allen Brain Atlas 뇌 조직의 두께 와 간격 비교	90
[그림 31] 동일 구조물의 시각화에 대한 Allen Atlas와 본 연구의 3차원 재구성 교육모델 비교	91
[그림 32] 기존의 2차원 사람 시상하부 교육자료와 본 연구의 3 차원 사람 시상하부 교육자료 비교	93

서 론

사람 시상하부(hypothalamus)는 시상 (thalamus) 아래에 위치하고, 셋째뇌실(third ventricle)을 둘러싸고 있으며 앞맞교차(anterior commissure)와 종말판(lamina terminalis)에서 시작하여 배쪽피개부(ventral tegmentum)까지 연장된 구조물이다. 배쪽 표면은 시각맞교차(optic chiasm)를 감싸고 있는 뇌척수액(cerebral spinal fluid)에 노출되어 있으며 유두체(mammillary body)의 꼬리 방향 가장자리(caudal edge)까지 연장되어 있다. 시상하부는 13 개 이상의 신경핵으로 구성되어 있는데 이들은 특정한 지형을 가지고 있으며 서로 기능적으로 연결되어 있다(Marcis 등, 2013). 해부학적으로 봤을 때 시상하부는 다른 뇌 구조물에 비해 상대적으로 크기는 작지만 심혈관 조절, 수면, 신진 대사, 스트레스, 체온 조절, 물과 전해질 균형, 식욕 조절, 성적 행동, 내분비 및 면역 반응을 포함한 중요한 신체 활동 조절역할을 담당하고 있다. 뿐만 아니라 시상하부는 항상성 조절의 중추이며 생존과 직결된 중요한 구조물이다(Baroncini 등, 2012).

이러한 시상하부의 중요한 기능 때문에 내부 신경핵과 미세구조를 밝히려는 여러 시도가 있었다. 대표적인 사례로 Allen Institute(Non-profit Bio Science Research Organization)에서 개발한 2차원 사람 뇌 지도가 있는데 동일한 사람의 전체 뇌 조직의 의학영상(MRI: Magnetic Resonance Imaging, DWI: Diffusion-Weighted Magnetic

Resonance Imaging)과 박절을 통해 얻은 절편의 조직학 염색 이미지를 함께 제공하고 있다(Ding 등, 2009; Amunts 등, 2010; Caspers 등, 2013a, b; Pascual 등, 2015). 특히 이 지도에 사용된 조직학 영상은 세포 해상도($0.4\sim 1\text{ mm/pixel}$)를 구현하여 뇌 단면을 거시적인 관점에서부터 현미경적 특징까지 연결하여 관찰할 수 있도록 하였다(Ding 등, 2016). 그러나 Allen Institute의 사람 뇌 지도는 2차원 염색 이미지를 바탕으로 하고 있으며 3차원 지도는 제공하고 있지 않아 각 신경핵의 위치관계 및 미세구조를 공간지각적으로 이해하는 데 어려움이 있다. 그 밖에 보고된 대부분의 사람 시상하부 3차원 지도는 MRI 데이터를 기반으로 작성되어 있기에 신경핵 단위의 상세한 미세구조를 파악하는 것이 어렵다(Baroncini 등, 2012). 따라서 시상하부의 신경핵과 미세구조의 위치관계를 공간지각적으로 파악할 수 있게 하는 3차원 지도가 필요하다. 본 연구에서는 사람 시상하부의 3차원 재구성 모델을 개발하는 것을 목표로 하였으며 이를 달성하기 위해 조직의 3차원 재구성 제작 protocol을 개발하였다.

미시적인 관점에서부터 거시적인 관점까지 인체 구조물의 2차원 영상을 3차원으로 재구성하려는 시도는 이전부터 있어 왔다. 우리 몸을 구성하는 모든 요소는 입체적인 구조를 하고 있으므로 공간지각적 분석을 위해 3차원 재구성 영상기술이 필요하다. 사람 몸 전체와 각 계통의 3차원 정보는 해부시신의 맨눈 관찰, 컴퓨터 단층촬영(CT: Computed Tomography), 자기공명영상(MRI) 같은 영상기기 활용뿐만 아니라 Visible Human 시신 연속절단면영상의

재구성 등을 통하여 이미 알려져 있다(Park 등, 2005; Siewerdsen 등, 2011). 조직 수준에서도 3차원 구조정보를 얻기 위해 다양한 시도가 있었고 여러 기기와 소프트웨어가 사용되고 있다. 일반적으로 조직학 정보를 얻기 위해 사용되는 영상들은 얇게 자른 평면을 대상으로 한 현미경 사진이 대부분이다. 그러나 이는 절단면의 위치에 따라 형상이 상이하므로 대상 조직의 실제적인 3차원 구조를 이해하는 데 한계가 있다. 따라서 조직표본의 3차원 구조에 대한 정보를 제공할 수 있는 재구성 기법이 필요하며 Studer 등(2008)은 이것을 3차원 조직학(3-dimensional histology)이라 정의하였다.

재구성된 3차원 조직 염색 영상은 병변의 위치와 형태에 대한 직관적인 지식을 전달해 주기 때문에 주로 의학과 의과학 분야에서 연구되어 오고 있다. Song 등(2007)이 털주머니에서 털세움근과 기름샘과의 상관관계를 3차원 재구성하여 기름샘의 분비기전을 알아낸 연구는 조직 절편의 2차원 영상을 조합한 3차원 조직학의 한 예이다(Song 등, 2007; 김주현, 2013). 또한 이렇게 재구성된 이미지는 자기공명영상과 컴퓨터 단층촬영이 제공하지 못하는 미세구조 정보를 시각화 했다는 점에서 가치가 있다. 이러한 이유로 조직 3차원 재구성은 노동 집약적이고 장시간을 요구하는 기술임에도 불구하고 여러 학자들이 시도해 오고 있다(Hashimoto 등, 2016).

조직 3차원 재구성의 발전은 전체 슬라이드 이미지(WSI: Whole Slide Imaging) 획득 기술 개선으로 가속화되었다(Ghaznavi 등, 2013; Griffin 등, 2017). 이를 기반으로 형성된 조직 3차원 재구성 모델은

의학 연구에 있어 3차원 조직학과 같은 새로운 접근법을 가능하게 하였다(Roberts 등, 2012; Magee 등, 2015). 조직의 3차원 재구성은 종양의 발견과 치료에 유용한 정보를 제공하므로 병리학적 진단에도 많이 활용되고 있다. 또한 종양의 다른 세포 유형 간의 이질성 및 상호 작용을 관찰하는 데도 매우 용이하다(Rusk, 2016; Ledford, 2017).

조직의 3차원 재구성은 통상적인 고정과 조직처리 과정 후 대상 표본의 연속 절편을 제작, 각 절편의 2차원 영상을 하나하나 얻는 과정을 거친다. 이후 각 절편의 2차원 영상을 컴퓨터와 소프트웨어를 활용하여 3차원으로 재구성한다(Mancon 등, 2001; Fiala 등, 2005).

조직 3차원 재구성을 성공적으로 수행하기 위해서는 각 단계에서 발생할 수 있는 왜곡과 인공물(artifact)의 영향을 최소화해야 한다. 특히 수동 박절 과정에서 발생하는 불규칙한 절편의 두께와 조직 전처리 과정에서 발생하는 조직 접합, 포매 시 발생한 거품, 염색 변이, 외형 뒤틀림 그리고 3차원 재구성 영상처리 과정에서 발생하는 정합 오류 등은 조직의 3차원 재구성 정확도에 큰 영향을 미친다(Maristela 등, 2012). 따라서 성공적인 조직 3차원 재구성을 위해서 각 단계에 적합한 기기와 소프트웨어가 사용된다. 조직 박절 과정에서는 자동 조직 박절기(Automated Tissue Sectioning System)를 사용하여 조직 두께의 일관성을 높이고 수축을 최대한 방지하고 있으며 (Maristela 등, 2016) 조직 영상 정합 및 3차원 재구성에는 Voloom (microDimensions, Munich, Germany), Panoramic viewer 1.14.50 (3DHISTECH, Budapest, Hungary), 3DView (3DHISTECH,

Budapest, Hungary), BioVis3D (BioVis3D, Montevideo, Uruguay)와 같은 소프트웨어를 사용하여 영상 배열의 오류를 최소화하고 최종적인 3차원 영상의 정확도와 신뢰도를 높이고 있다. 그러나 현실적으로 매우 고가인 기기와 소프트웨어를 전부 갖추기란 쉽지 않으므로 기존의 3차원 재구성 연구는 제한적인 소수에 의해 이루어져 온 것이 사실이다. 설령 이러한 조직 3차원 재구성 소프트웨어를 갖췄다 하더라도 조직 박절 및 전처리 단계의 왜곡이 최소화 되어있지 않을 경우 다양한 변수에 대처하기 어렵다. 수동 정합 기능이 있더라도 조직에 구멍과 요철이 많을 경우 조직 절편의 팽창과 수축, 접힘이 발생하므로 조직 가장자리 인식 기반 정합의 알고리즘을 제공하는 소프트웨어를 사용하더라도 효과적인 3차원 재구성으로 이어질 수 없다. 이뿐만 아니라 기존의 소프트웨어들은 염색된 조직 영상의 대조도를 기반으로 자동 구역화 기능을 제공하기 때문에 명도대비가 명확하지 않은 조직 염색 영상의 경우 만족스러운 결과를 얻기 어렵다. 특히 사람 뇌조직은 미세구조와 신경핵 분포양상의 염색 대조도가 뚜렷하지 않으므로 기존의 소프트웨어가 제공하는 자동 구역화기능을 적용하기에 부적합하다. 또한 장비와 소프트웨어가 갖춰져 있다 하더라도 복잡한 인터페이스의 사용법을 익히는 것은 쉽지 않으므로 조직 3차원 재구성 연구는 진입장벽이 무척 높은 편이다.

이러한 단점들을 극복하기 위하여 본 연구에서는 기존에 수행된 연구에 사용된 것들보다 상대적으로 접근성이 용이한 기기와 소프트웨어를 활용하여 조직의 3차원 재구성을 구현하는 방법을

개발하고자 하였다. 이를 통하여 종래 제한적인 소수에 의해 이루어져 왔던 조직 3차원 재구성을 보다 넓은 범위의 연구자들이 수행할 수 있도록 하는 것을 목표로 하였다(Chapter 1). 이렇게 개발된 방법을 시상하부 조직의 3차원 재구성에 적용하여 지금까지 보고된 바 없는 사람 시상하부의 3차원 지도를 개발하고자 하였다(Chapter 2).

Chapter 1.

조직의 3차원 재구성 제작 protocol 개발

목 차

목 차	16
서 론	18
연구 대상 및 방법.....	21
1. 조직 검색 영상의 디지털화	22
1) 조직 슬라이드 스캔	22
2) 조직 스캔 영상 편집	23
3) 영상 해상도 조절	24
4) 조직 영상 정합	25
2. 구역화를 통한 2차원 지도 제작.....	28
1) 구역화 영역 레이어 생성 및 Path 제작	28
2) 구역화 영역 면 채우기	28
3. 3차원 재구성을 위한 2차원 지도 파일 전산 처리	31
1) 전체 레이어 영상 흑백 변환 및 내보내기	31
2) 흑백 영상의 인공물 지우기	32
3) 흑백 영상 내보내기	32
4) 각 구조물 영상 개수 통일	32
5) 흑백 영상의 색상 반전, bit 수 재설정, 확장자 변환..	33
4. 3차원 영상 재구성	38
1) Z값 수정 및 시각로 3차원 재구성	39
2) 전체 조직 3차원 재구성	41
3) 3차원 재구성 영상 좌우 반전	41
4) 생성된 마스크 추출 및 내보내기	41
5. 3차원 교육 모델 제작	42
1) 3차원 재구성 영상 편집	42
2) 교육용 WebGL 생성	42

결 과.....	45
1. 조직 3차원 재구성 부피 모델 및 3차원 재구성 표면 모델	45
2. 조직 3차원 재구성 교육 모델	45
3. 조직 3차원 WebGL 교육 모델	45
고 찰.....	47
1. 타 소프트웨어와의 비교	47
2. 기존의 3차원 재구성 방법론과의 비교	48
3. 기존의 조직 3차원 재구성 방법론과의 비교	50

서 론

조직학 영상의 3차원 재구성은 세포 수준에서 해부학 및 질병을 이해하는 데 유용한 분석을 가능하게 하는 기술이지만 결과를 얻기 위해 많은 시간이 소요된다는 점에서 노동 집약적인 기술로 간주되고 있다(Senter-Zapata 등, 2016). 그럼에도 불구하고 병변의 예후 및 치료에 매우 유용한 정보를 제공한다는 점에서 가치가 있으며 지속적으로 연구되어 오고 있다(Onozato 등, 2012; Farahani 등, 2017).

이러한 3차원 조직학의 중요성을 인지하고 진행되어 온 기존의 연구들이 있다. Onozato 등(2012)은 3차원 재구성을 통해 절제된 폐 선암의 형상을 구축 하였다. Fonyad 등(2015)은 쥐 관상 동맥 계통을 3차원 재구성하여 심장동종이식혈관병증(CAV: cardiac allograft vasculopathy)을 정량적으로 분석 하는데 활용하였다. 또한 Senter-Zapata 등(2016)은 포르말린 고정 및 2 % Lugol 염색한 쥐 뇌, 사람 자궁 조직과 폐 조직을 3차원 재구성 하였다. 뿐만 아니라 3D Slicer와 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 파라핀 포매 전후의 조직에 대한 영상 분석을 실시하여 조직이 고정 단계와 포매 단계 사이에서 어떻게 변화하는지 파악하였다. Merrill 등(2017)의 연구에서는 유방 절제술을 위한 지침을 얻기 위해 일반적인 유방암 종의 3차원 미세구조 및 성장 패턴을 3차원 재구성하였다. 이를 위해 9개의 유방암 종 조직의 연속 절편을 사용하였으며, 종양의 3차원 재구성을 통해 유방조직 내

특징적인 성장패턴을 분석할 수 있었고 절제 수술에 유용한 정보를 제공받을 수 있었다. 또한 Katz 등(2009)의 연구에서는 남미물개의 난소 조직을 대상으로 조직 3차원 재구성 연구를 수행하였다.

조직의 3차원 재구성 과정에는 박절 시 불규칙한 조직 두께, 포매 시 조직 접힘, 영상 스캔 시 밝기 값 불일치 등의 요인들로 인해 정보 누락과 정렬 오류가 발생한다. 이는 자동화 되어있지 않은 수동 조작 과정에서 더욱 빈번하게 발생하는 문제들이다(Senter-Zapata 등, 2016). 이러한 이유로 Onozato 등(2012)의 연구에서는 조직 전 처리 과정에 Kurabo AS-200S Automated Tissue Sectioning System(Kurabo Industries, Osaka Japan)과 같은 자동 로봇 시스템을 도입하였고, 영상처리와 3차원 재구성에는 Pannoramic Viewer 1.14.50 (3DHISTECH, Budapest, Hungary) 소프트웨어를 사용하여 발생하는 변수를 최대한 방지하고 있다. Fonyad 등(2015)의 연구에서도 Pannoramic Scan(3DHISTECH)를 사용하여 조직 영상처리를 수행하였고, Voloom (microDimensions, Munich, Germany) 소프트웨어를 사용하여 3차원 재구성을 시행하였다. 그러나 일반적으로 이와 같은 고가의 소프트웨어와 기기를 갖추기란 어렵기 때문에 조직 3차원 재구성 연구를 완수할 수 있는 실험실은 거의 없다(Hanna 등, 2019).

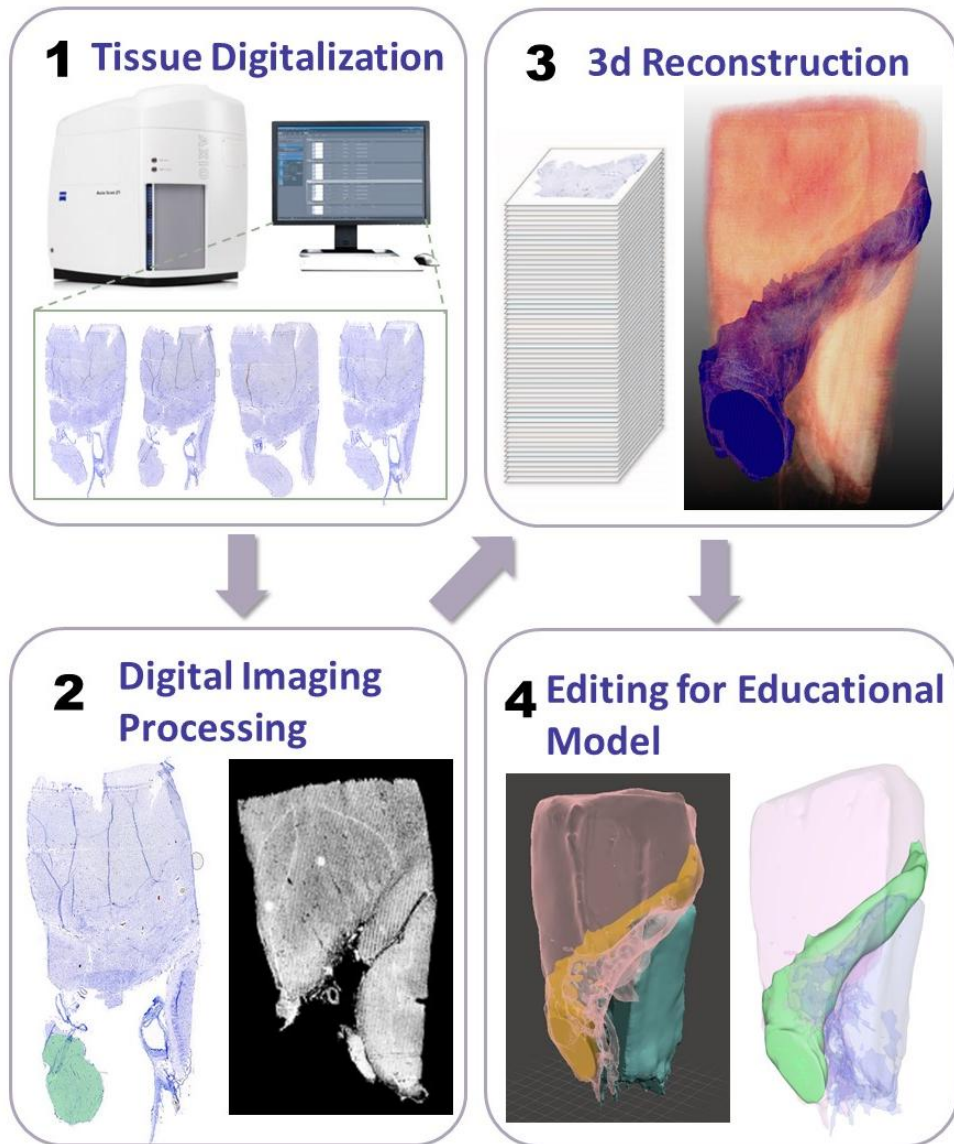
위 연구들에서 대상으로 하는 폐 선암 조직, 쥐 뇌 조직, 쥐 관상동맥 조직은 핵 밀집 양상이 뚜렷한 구조물이므로 조직 염색 시 영상의 밝기 값 대조도가 우수하다. 따라서 Fonyad 등(2015)이

연구에 사용한 Voloom 소프트웨어는 밝기 값 기반의 자동 구역화 기능을 사용했을 때 구역화 영역을 효율적으로 추출해 낼 수 있다. 그러나 염색 영상의 밝기 값 대조도가 낮은 조직의 경우 이러한 자동 구역화 기능을 활용하여 연구를 수행하는데 한계가 있다. 또한 이러한 소프트웨어에서 제공하는 자동 정합 기능은 수동 조직 전처리 과정을 진행했을 때 불가피하게 발생하는 조직의 탈락, 접힘, 외형 왜곡과 같은 다양한 변수를 고려하지 못하므로 정상 조직의 영상까지도 왜곡 또는 누락시키는 문제점이 발견되었다.

따라서 본 연구에서는 갖춰져 있는 연구실 장비를 최대한 활용하면서도 접근성 높은 소프트웨어를 사용하여 조직 3차원 재구성을 수행할 수 있는 protocol을 확립하고자 하였다. 이를 통하여 종래 제한적인 소수에 의해 이루어져 왔던 조직 3차원 재구성을 보다 넓은 범위의 연구자들이 수행할 수 있도록 하는 것을 목표로 하였다.

연구 대상 및 방법

본 연구의 진행 순서와 작업공정을 그림 1에 요약하였다.



[그림 1] 전체 과정 공정도

1. 조직 영상의 디지털화

본 연구에서는 동결절편 후 염색된 사람 시상하부 조직과 그 내부에 속하는 구조물인 시각로를 대상으로 수행하였다.

1) 조직 슬라이드 스캔

염색한 조직의 스캔에는 ZEISS Axio scan.Z1 (ZEISS, Oberkochen, Germany)을 사용하였다. Axio scan은 다량 슬라이드의 단시간 자동 스캔 기능을 제공하므로 시료의 연속 절편 영상을 얻는 시간을 단축시킬 수 있었다. 총 100장의 슬라이드를 20X 배율로 촬영 및 스캔 하였으며, 장당 10-12분 가량 소요되었다.

Axio scan의 사용시 PC에 설치된 ZEN2.3lite (ZEISS) 소프트웨어를 사용하여 스캔 조건을 설정하였다. Zen slidescan 탭에서 스캔 조건을 선택한 뒤 Scan Profile에서 광학모드(BF)와 20X를 선택, Open tissue detection wizard 탭의 히스토그램을 조정하여 조직이 있는 영역을 감지하였다. 염색이 뚜렷하게 된 조직 슬라이드는 자동화 기능 이용하여 조직 감지 과정을 진행하였다. 그러나 염색 양상이 불명확하거나 모호한 경우 추가적인 영역설정이 필요했으므로 수동 작업을 병행하였다. Graphics 탭에서 올가미 툴을 사용하여 슬라이드 영상 위에 직접 그려 영역 추가를 진행하였으며 각각 별도의 영상으로 스캔 되었다. 스캔 영역을 모두 설정한 뒤 Finish 탭을 선택하고 스캔을 진행하였다. 스캔을 완료한 뒤 확장자는 Carl Zeiss Image (*.czi)로 변환하였다.

2) 조직 스캔 영상 편집

모든 조직 스캔 영상을 ZEN2.3lite 오픈소스뷰어 software에서 편집하였다. 이 소프트웨어는 ZEISS 홈페이지 (<https://www.zeiss.com/>)에서 무료 다운로드가 가능하다. ZEN 소프트웨어 실행 후 추후 과정에 필요한 두 가지 설정을 진행하였다. 첫 번째로, 시료 영상의 염색 양상이 뚜렷하게 보이도록 영상 대조도를 조정해 주었다. File 탭에서 원하는 조직 영상을 불러온 뒤, Display 탭에서 히스토그램을 조정하여 gray mater와 white mater의 육안 구분이 용이하도록 값을 설정해 주었다[그림 2]. 이 과정은 시각로(Optic tract)의 구역화(segmentation) 업무 난이도에 영향을 미치므로 주의하며 진행하였다. 각 슬라이드의 미세한 염색 변이를 육안으로 관찰하며 각 영상에 최적화된 값을 설정해 주었다.

두 번째로, CZI format file의 시료 스캔 영상을 Adobe Photoshop CC 2019 (Adobe, San Jose, USA) 편집에 용이한 JPEG 확장자로 변환하였는데, 이는 추후 진행되는 핵 구역화에 용이하도록 하기 위함이다. Process 탭에서 Image Export를 선택한 뒤 Parameter 탭에서 JPEG File Interchange Format(JPEG)을 설정하였다. 그리고 내보내기(export) 과정 시 disk memory 부족 현상을 방지하기 위해 이미지를 Quality 13%, Resize 14% 이하로 설정하여 용량을 축소하였다. 위의 두 과정을 마친 뒤 Apply 탭을 통해 내보내기(export) 하였다.

이렇게 export한 JPEG 파일은 각 파일명으로 폴더가 생성되고 그 안에 저장되었다. 폴더 명은 추후 과정에 용이하도록 슬라이드 넘버와 동일하게 재 정리하였다. 슬라이드 스캔 시 시료 영역뿐 아니라 레이블 구역에 적힌 정보도 함께 스캔 및 저장되므로 info 탭에 들어가 슬라이드 넘버를 확인하며 진행하였다.

3) 영상 해상도 조절

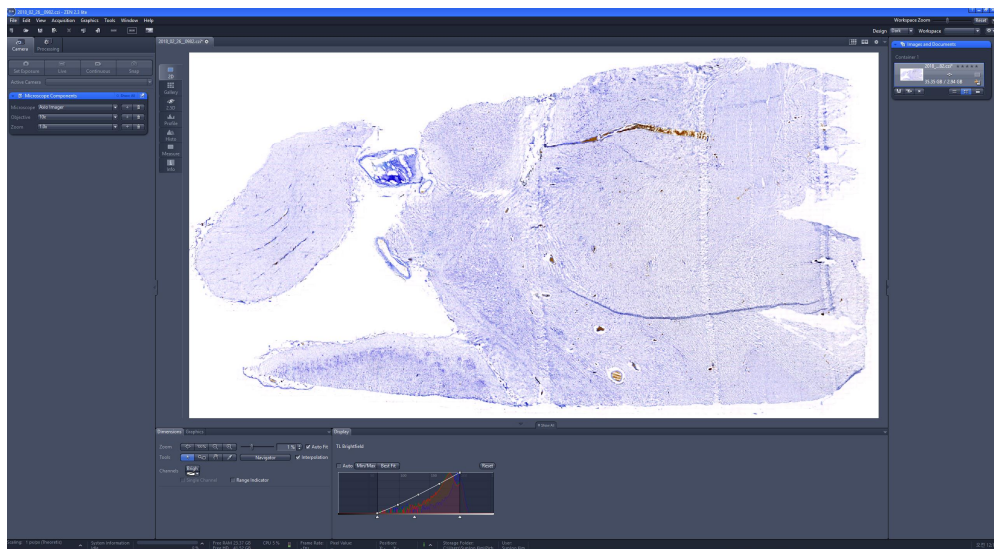
내보내기 한 시료 영상을 정합하기 위해서 다음의 두 과정을 실행하였다. 첫 번째로, 추후 편집의 용이성을 위해 각 영상의 해상도를 다시 한번 낮춰주었다. ZEN 소프트웨어에서 내보내기 한 영상을 그대로 정합(registration)에 사용할 경우, 파일 용량이 매우 커지므로 일반 사양의 PC 작업이 불가능하기 때문에 파일의 용량을 낮추고 저장하는 과정이 필요하다. 이 과정에는 Adobe Photoshop CC를 사용하였다. Adobe Photoshop에서 시료 영상 열기를 실행한 뒤, Image size 탭에서 heights 15 cm, resolution 72 로 조정하였다. Heights 값이 15 cm보다 작은 경우 해상도가 매우 낮아져 핵의 육안 구분이 용이하지 않았다.

두 번째로, 저장된 영상들을 한 폴더에 정리하여 한꺼번에 확인이 가능하도록 하였다[그림 3]. 이 과정을 통해 정리된 자료들은 추후 2차원 정합 및 보간법 적용, 3차원 적층 과정에도 편리성을 제공하였다.

4) 조직 영상 정합

시각로 구조물의 구역화 및 재구성(reconstruction)을 위해 조직 영상 정합을 실시하였다. 첫 번째 영상을 기준으로 후속 영상들을 모두 불러오기 하여 한 파일에 포함시켰다. 각 영상은 동일한 명칭의 레이어로 정렬하여 layer 탭에서 한눈에 확인할 수 있도록 하였다.

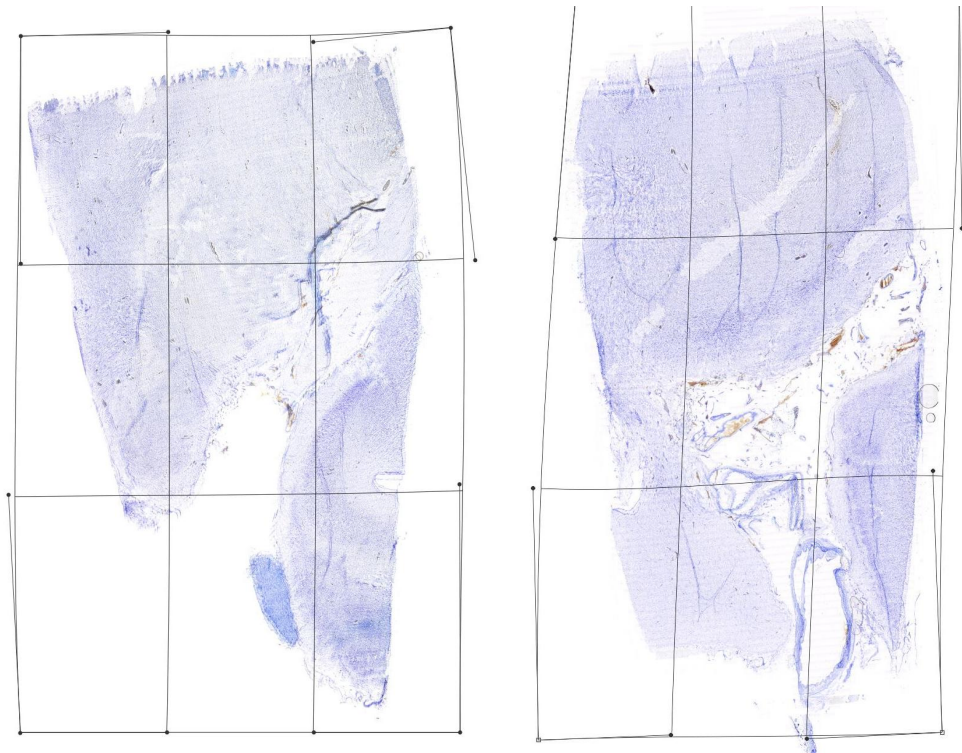
정합을 위해 연속되는 두 영상의 레이어만 가시화 시킨 뒤, 선행하는 레이어에 30% 투명도를 주어 두 장을 동시에 확인할 수 있도록 하였다[그림 4]. 투명도는 Transparent 탭에서 조절하였고 표지점이 되는 구조물들과 조직의 외곽선을 기준으로 정합을 실시하였다. 표지점으로 삼은 구조물들은 미세혈관, 시각로, 안쪽후각겉질의 외곽선이였다. 앞 조직 영상을 투영하며 뒤 조직 영상을 동시 확인한 뒤 Scale과 Warp 툴을 사용하여 형태 교정 및 위치 정합을 실시하였다[그림 5]. 특히 transform 툴은 동결절편 제작 시 발생하는 외형 왜곡을 교정할 때 유용하였다. 시각로와 안쪽후각겉질의 위치 이탈 현상이 3개의 슬라이드에서 관찰되었고 원 위치로 교정되었다.



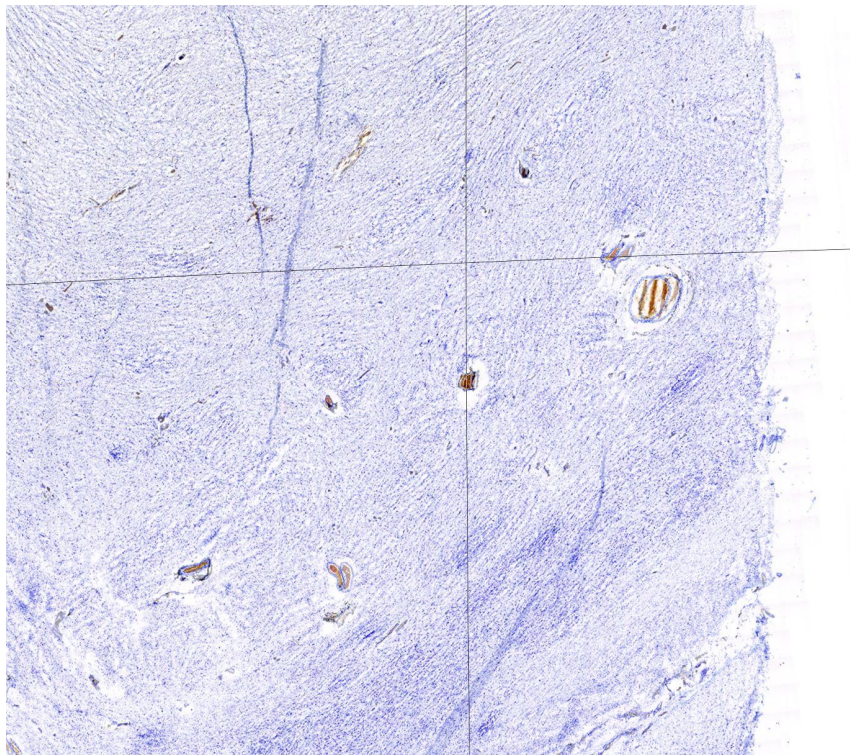
[그림 2] ZEN2.3lite 소프트웨어를 이용한 스캔 영상처리



[그림 3] Photoshop 해상도 조정 후 번호 순으로 정리 된 조직 염색 슬라이드 영상들



[그림 4] Photoshop에서 Warp 툴을 이용하여 왜곡 교정 및 정합하는 과정



[그림 5] Photoshop 정합 과정의 기준점이 되는 미세혈관과 조직 외곽선 확대도
5) 조직 염색 이미지 폴더 분류

후속 과정인 핵 구역화 과정의 편의성을 고려하여 정합이 완료된 조직 염색 슬라이드 영상들은 동일한 명칭의 폴더를 만들고 그 안에 포함시켰다.

2. 구역화를 통한 2차원 지도 제작

1) 구역화 영역 레이어 생성 및 Path 제작

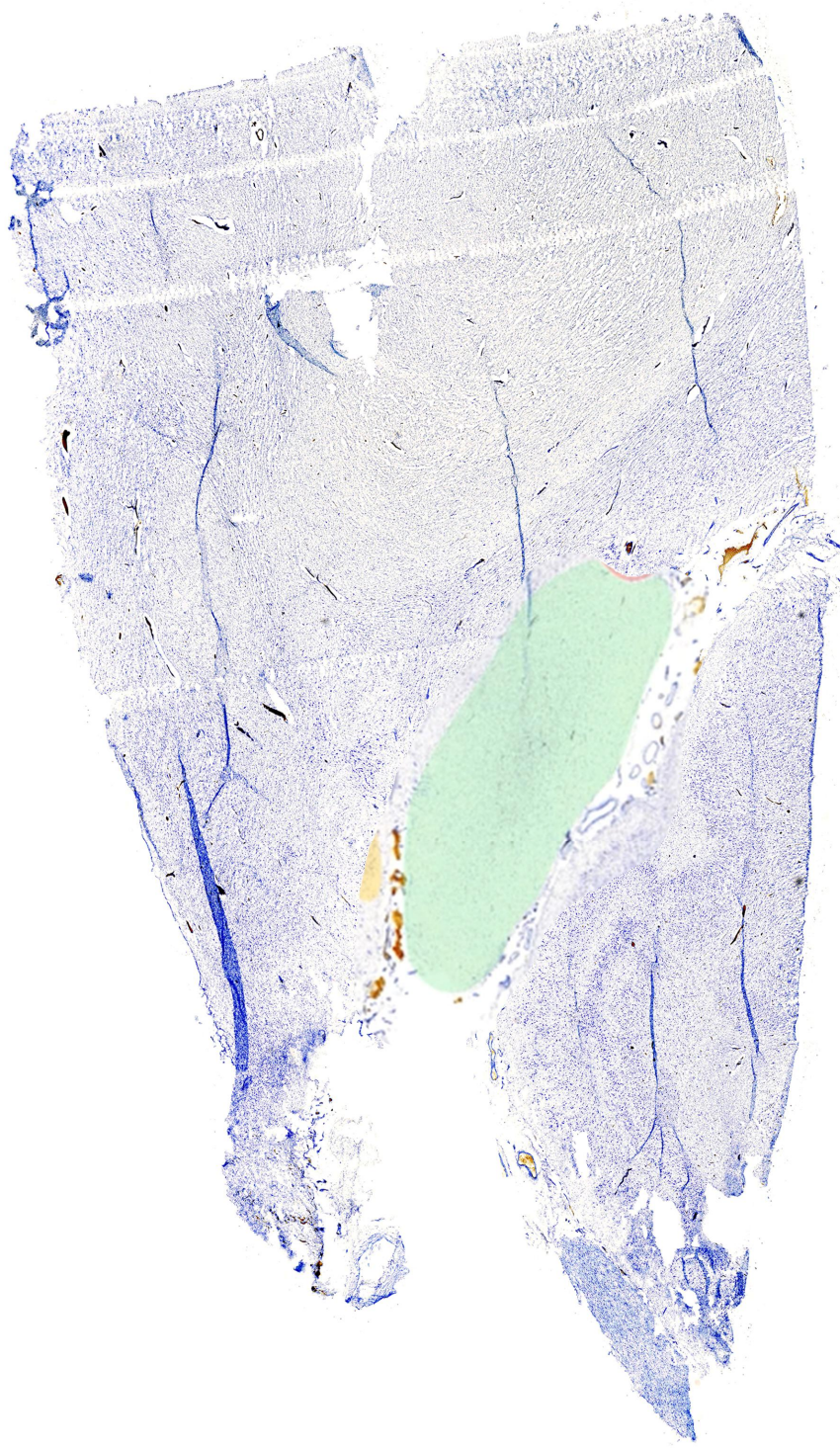
Allen human brain atlas를 참고로 하여 각 조직 염색 슬라이드 영상의 시각로 영역을 구역화 하였다. Allen human brain atlas는 오픈소스이므로 다음의 웹 주소로 접속하여 확인하였다(atlas.brain-map.org). 총 106장의 슬라이드 영상에 시각로 구조물 영역이 모두 포함되었고 allen atlas를 참고하여 구역화를 수행하였다.

폴더 안에 레이어를 생성하고 명칭을 ‘슬라이드 숫자_시각로’로 변경한 뒤 시각로 영역을 Path 툴을 사용하여 제작하였다. Path 툴 사용 시 Path 탭에도 레이어가 자동으로 생성되는데 이 명칭을 레이어 명칭과 동일하게 변경하여 추후 작업에 혼선이 없도록 하였다. 영역 수정이 필요한 경우에는 해당 Path 레이어를 선택, 커서와 핸들을 조정하여 의도에 맞게 변형시켰다.

2) 구역화 영역 면 채우기

Path 툴로 제작한 시각로 구역화 영역이 완성되면 Path 탭의 Load Path as Selection을 적용하여 선택영역으로 활성화시켰다. 이 후

원하는 색상을 설정한 뒤 면을 채워 넣었다[그림 6]. 구역화를 효율적으로 진행하기 위해 각 조직 염색 슬라이드 영상 전 후 관계를 고려하였고, 이는 3차원 재구성 과정에서 발생하는 계단현상을 최소화하는 목적으로 수행되었다. 앞 슬라이드 영상에 투명도를 주어 뒷장 슬라이드 영상 구역화에 참고하였다.



[그림 6] Photoshop을 사용하여 제작한 시각로의 구역화 2차원 지도

3) 소실된 조직 염색 슬라이드 영상 수동 보간법 제작

조직 접합, 탈락으로 소실된 11장의 슬라이드를 수동 보간법(manual interpolation)으로 제작하였다. 소실된 슬라이드는 61번, 306번, 316번, 321번, 381번, 386번, 391번, 396번, 431번, 436번, 466번 슬라이드였다. 먼저 소실된 슬라이드의 숫자와 동일한 폴더를 만들고 순서에 맞게 정렬하였다. 그 후 소실된 슬라이드의 앞, 뒤의 구역화 레이어를 가시화시킨 뒤, 소실된 슬라이드의 숫자만큼 길이 값을 등분하여 구역화 영역을 제작했다. 이 과정을 통해 총 108개의 상위 폴더를 얻을 수 있었다.

3. 3차원 재구성을 위한 2차원 지도 파일 전산 처리

1) 전체 레이어 영상 흑백 변환 및 내보내기

3차원 재구성 소프트웨어에는 흑백 마스크의 이미지가 사용되므로 모든 폴더 영상들을 흑백으로 바꿔주었다[그림 7]. 일반적으로 3차원 재구성에 사용되는 마스크(segmentation mask)는 배경을 0(검은색), 전경을 1(흰색)로 구분한다. 그러나 조직 전체 형태를 정확히 인식하고 대조 값을 주기 위해서는 배경을 1(흰색), 전경을 0(검은색)으로 작업하는 것이 육안 확인에 용이하였다. 이 과정을 통해 제작된 흑백 영상들은 추후 ImageJ (LOCI, University of Wisconsin, Madison, USA) 소프트웨어를 사용하여 배경색과 전경색을 반전시켜 주었다. 조직 염색 영상을 흑백으로 전환시키기 위해 Image탭의 Mode에서

Grayscale을 선택하였다. 그리고 전경색과 배경색의 뚜렷한 흑백 대비를 위해 Image탭의 Adjustments에서 Level 값을 조정하였다. 시각로 구역화 영상은 레이어의 빈 영역 잠금 기능을 활성화시킨 뒤 검은색으로 채운 뒤 한 폴더에 저장하였다[그림 8].

2) 흑백 영상의 인공물 지우기

재구성 과정에서 정돈된 결과물을 도출해내기 위해 봉입(mounting) 시 생긴 인공물(artifact)을 erase 툴을 사용하여 삭제하였다.

3) 흑백 영상 내보내기

각 레이어 영상을 JPEG 확장자로 내보내기 하였다. 추후 3차원 재구성 마스크를 제작할 때 폴더 단위로 선택 및 적용하여 연속 영상 전체를 불러오기 해야 하므로 제작과정의 용이성을 위해 구조물 별로 폴더를 생성, 그 안에 해당 흑백 영상을 저장하였다.

4) 각 구조물 영상 개수 통일

추후 3차원 재구성 소프트웨어를 사용하기 위해 각 구조물을 구성하는 영상의 수를 모두 동일하게 맞춰주었다. 이 과정을 통해 모든 구조물이 같은 크기와 비율로 생성될 수 있도록 하였다. 영상 수의 기준은 전체 조직 영상에서 빈 레이어 두 장을 합친 개수로 정하였다. 구조물 내부를 채운 형태로 3차원 재구성하기 위해서는 첫 장과 마지막 장

에 빈 레이어 영상이 필요하다. 그러므로 전체 조직 영상 100장과 첫 번째 빈 레이어 한 장, 마지막 빈 레이어 한 장을 포함하여 총 102장의 영상 개수를 정하였다. 이 후 모든 구조물의 영상 개수를 102장으로 동일하게 맞춰주었다.

5) 흑백 영상의 색상 반전, bit 수 재설정, 확장자 변환

3차원 재구성 소프트웨어의 파일 처리를 위해 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 세 가지 과정을 수행하였다. 첫 번째로, 일반적인 구역화 작업에서 배경을 픽셀 값 0으로 저장하는 관행과 입력데이터의 일관성 통일을 위해 영상 반전(invert)을 수행하였다. 이 과정을 수행하기 위해 File 탭의 import에서 원하는 구조물 폴더 영상 중 첫 번째 장을 선택하여 연속 영상(image sequence)을 불러왔다. 그 후 Edit 탭에서 Invert를 선택한 뒤 102장의 영상을 모두 흑백반전 하였다[그림 9].

두 번째로, 3차원 재구성 소프트웨어가 원활히 구동될 수 있도록 파일 크기를 축소(rescale) 해 주었다. 크기와 상관없이 조직 전체 형상을 3차원 재구성하는 것이 목표이므로 파일 크기를 1/10로 축소하였다. 이 과정을 수행하기 위해 Image 탭의 Scale 창에서 X scale 0.1, Y scale 0.1, Z scale 1로 설정하였다.

세 번째로, 영상의 bit값을 변경해 주었다. 3차원 재구성 소프트웨어는 grayscale의 영상만 구현하므로 조직 전체 영상에 해당하는 마스크를 16bit로 변환하였다. 그리고 각 구조물에 해당하는 마스크들은 흑백

영상만을 반영하므로 8bit로 변환하였다. 이 과정을 수행하기 위해 Image 탭의 Type에서 bit 값을 변환 목적에 맞게 설정하였다.

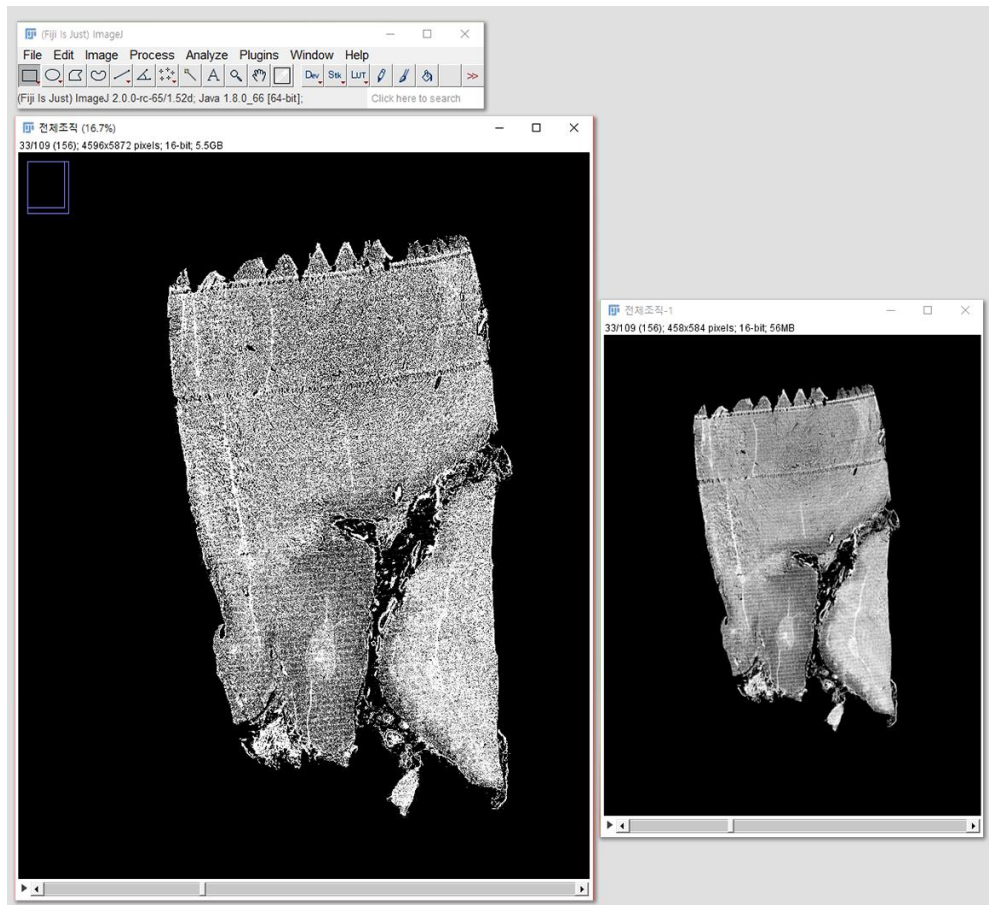
네 번째로, 확장자 형식을 변경해 주었다. 3차원 재구성 소프트웨어에서는 JPEG 형식을 지원하지 않으므로 로딩이 가능한 NIFTI-1(전체) & Raw data (mask) 확장자로 변환해 주었다. 조직 전체 영상에 해당하는 파일은 NIFTI-1 확장자로, 시각로 영상에 해당하는 파일은 Raw data로 변환하였다.



[그림 7] Photoshop에서 흑백 변환한 조직 슬라이드 영상



[그림 8] Photoshop에서 흑백 변환과 내보내기 후 폴더에 정리한 조직 영상들



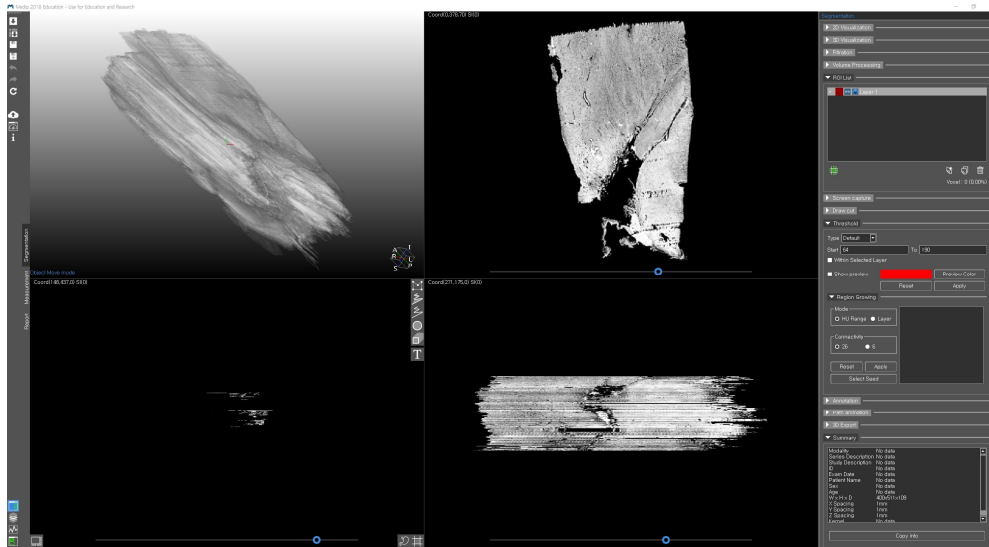
[그림 9] ImageJ에서 흑백 반전 및 크기 재설정을 수행한 조직 영상

4. 3차원 영상 재구성

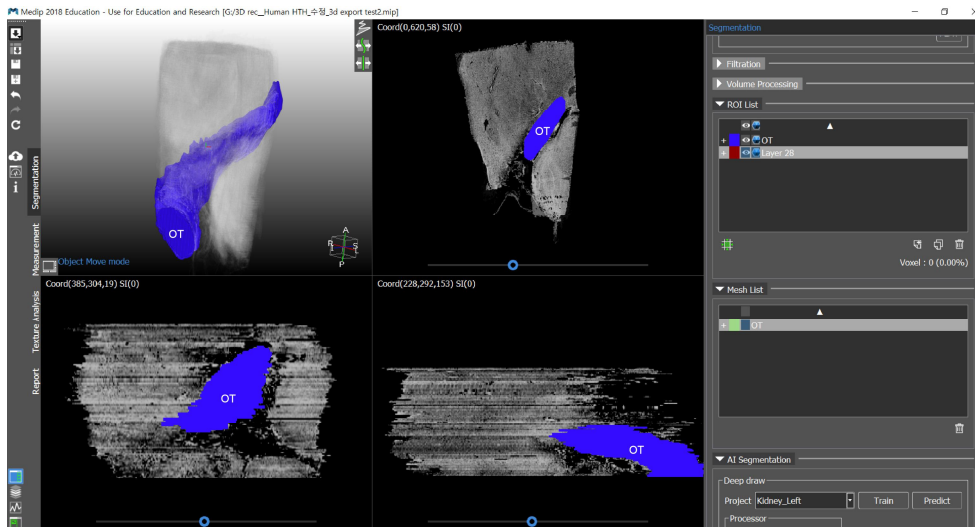
1) Z 값 수정 및 시각로 영상 3차원 재구성

3차원 영상 재구성을 수행하기 위해 MEDIP (MEDICAL IP, Seoul, Korea) 소프트웨어를 사용하였다. Open 탭에서 NIFTI-1 확장자 조직 전체 영상 파일을 선택하여 불러왔다[그림 10].

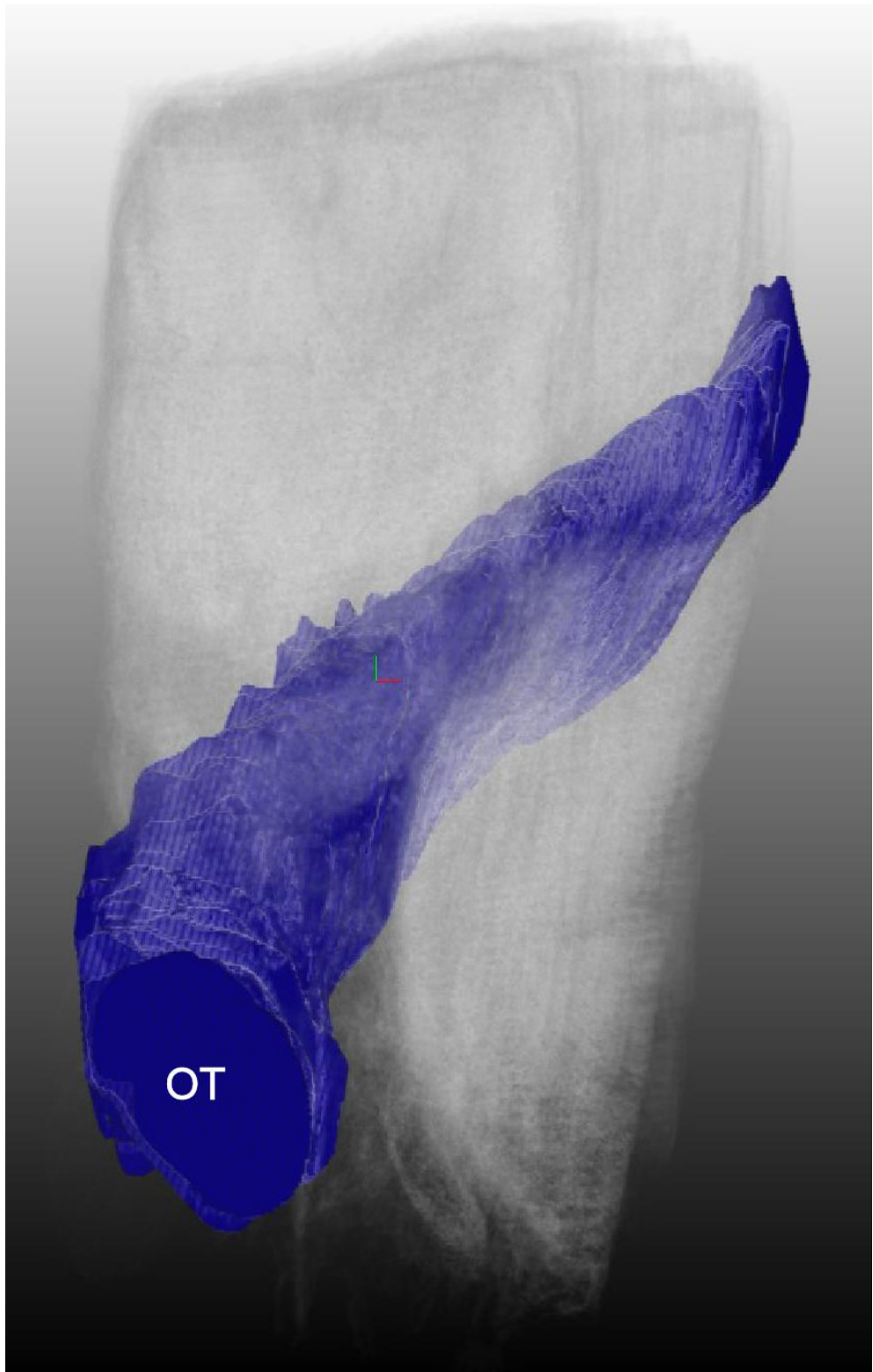
3차원 재구성 영상을 보며 높이 값의 재조정이 필요한지 확인하였다. 그 결과 3차원 재구성된 조직은 실제 조직에 비해 Z축으로 압축된 형태임을 확인할 수 있었다. 길이 값의 정확한 확인을 위해 먼저 실제 조직의 Z값을 계산해 보았다. 99개의 영상 간격(interval)과 마지막 조직의 두께를 합하여 총 두께 9.92 mm를 추출하였다. 그리고 이 99개의 영상 간격을 임의로 1px이라 가정하여 1px을 100 μ m로 추출하였다. 이 후 ZEN 소프트웨어를 사용하여 첫 번째 조직 염색 영상에서 동결 절편 시 생긴 두 인공물 (artifact) 간의 거리를 측정, 12 mm 값을 확인하였다. MEDIP 소프트웨어의 Measurement 탭에서 측정한 조직의 높이 값과 두 인공물 사이의 거리 비를 실제 두 지점의 길이 값 비와 동일한지 확인하였다. 그 결과 Z값의 길이가 부족한 것을 확인하였고, MEDIP 상에서 Z값은 151이 나와야 함을 확인하였다. 따라서 높이 값을 재조정하기 위해 ImageJ에서 scale 값 재조정을 수행하였다. Depth 값을 154로 조정하여 MEDIP에서 확인한 결과 동일한 길이의 z값이 나오는 것을 확인하였고 시각로 영상에도 동일한 과정을 적용하였다. 이 후 MEDIP에서 두 영상 마스크를 불러오기 하여 3차원 재구성을 수행하였다[그림 11, 12].



[그림 10] MEDIP 소프트웨어로 전체 조직 영상을 불러온 모습



[그림 11] MEDIP 소프트웨어로 시각로 Raw data mask를 불러오기 하여 3차원 재구성 한 모습. OT, optic tract.



[그림 12] MEDIP 소프트웨어를 이용한 시각로 3차원 재구성 모델. OT, optic tract.

2) 전체 조직 3차원 재구성

MEDIP의 segmentation 탭의 threshold에서 하운스필드 수치(HU: Hounsfield Units)를 조절한 뒤 적용하여 전체 조직을 3차원 재구성하였다.

3) 3차원 재구성 영상 좌우 반전

MEDIP의 기본 설정으로 조직을 3차원 재구성하면 좌우가 반전된 영상이 만들어지므로 이를 교정하는 작업을 수행하였다. Volume processing에서 Z-flip 기능을 두 차례 수행하여 이를 교정하였다.

4) 생성된 마스크 추출 및 내보내기

생성된 전체조직과 시각로 3차원 재구성 마스크를 추후 교육용 모델로 제작하기 위해 STL 확장자로 추출하였다. 이 과정에 앞서 3차원 재구성 물체 표면을 미리 보기 하기 위해 폴리곤 렌더링을 수행하였다. 교육용 3차원 재구성 모델은 표면의 요철과 계단현상을 최소화하는 것이 목표이므로 smoothing 기능을 활용하여 이를 보완하였다. 시각로 레이어를 선택하고 3D export 탭의 smoothing 값을 200-300으로 설정한 뒤 preview surface를 수행하여 표면모델을 추출하였다. 추출된 마스크는 Export as 탭에서 stereolithography(*stl) 확장자로 내보내기 하였다.

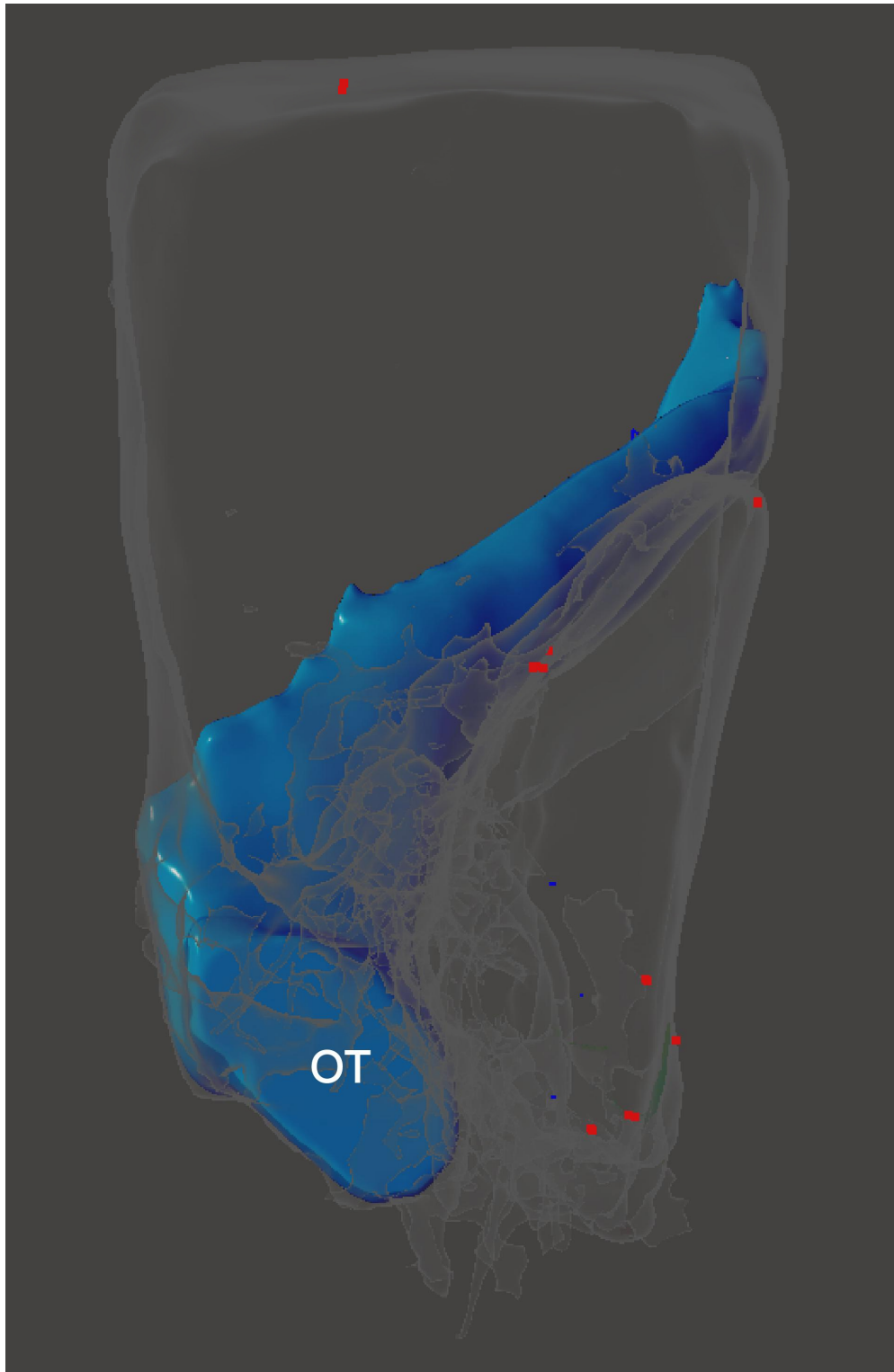
5. 3차원 교육 모델 제작

1) 3차원 재구성 영상 편집

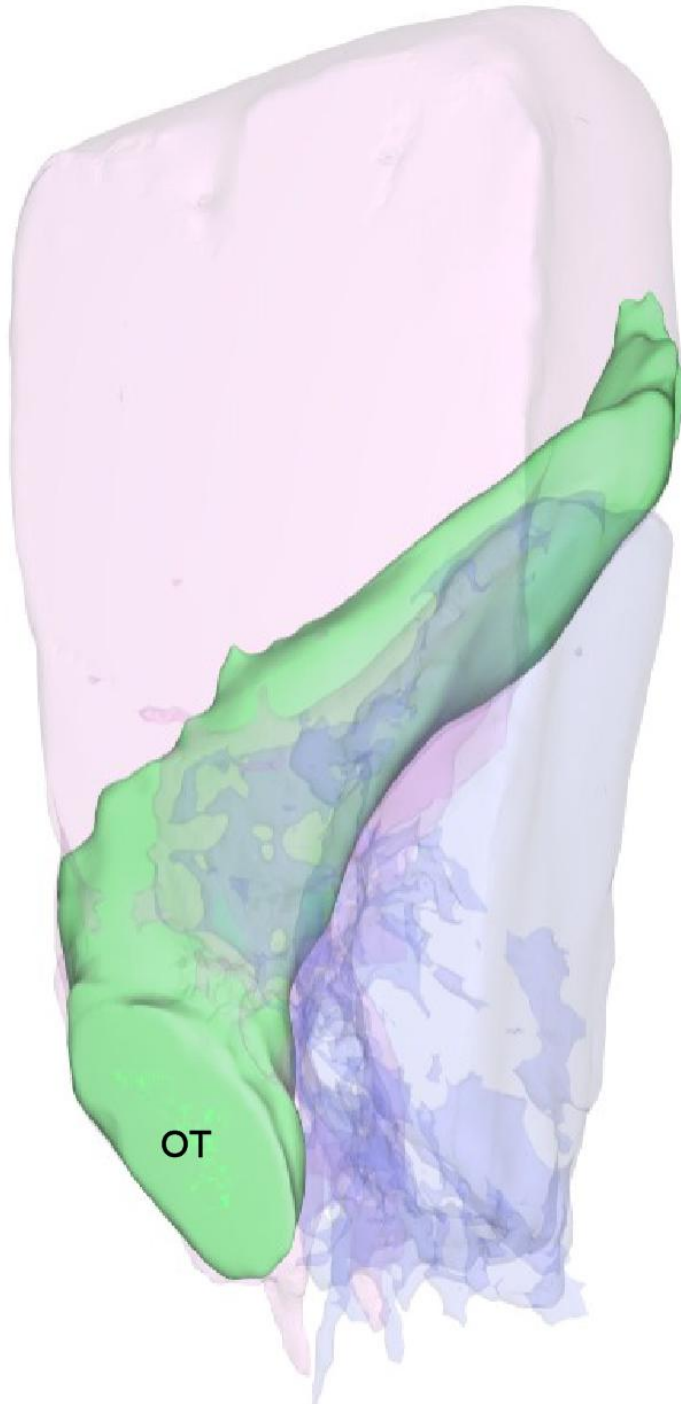
교육용 모델을 제작하기 위해 MeshMixer (Autodesk, San Rafael, USA) 소프트웨어를 사용하여 3차원 재구성 표면 모델의 계단현상 완화 및 이상점(outlier) 조정을 수행하였다. 해부학적 구조를 고려하며 Sculpt 탭의 Brush를 활용하여 합리적인 형태 재조정을 수행하였다[그림 13]. 이 후 시각로 표면모델을 File 탭의 Export에서 STL 확장자로 내보내기 하였다.

2) 교육용 WebGL 생성

제작한 교육 모델은 WebGL (Web Graphics Library) 주소를 생성하여 교육용 콘텐츠로 제작하였다. WebGL은 플러그인을 사용하지 않고 호환되는 웹 브라우저에서 상호작용이 가능한 2D/3D 그래픽 렌더링 자바스크립트 라이브러리이다. 이를 이용하여 개인 디바이스를 통해 접속할 수 있는 u러닝 (Ubiquitous Learning) 교육자료를 제작하였다[그림 14]. 학습자들이 개인 모바일 기기와 pc로 접속하여 각 구조물의 보이기/감추기 기능, 투명도 조절 기능을 조작하며 학습이 가능하다.



[그림 13] MeshMixer를 사용하여 제작한 시각로 3차원 교육 모델. OT, optic tract.



[그림 14] 완성된 시상하부 전체조직과 시각로 3차원 재구성 WebGL 교육 모델.
OT, optic tract.

결 과

1. 조직 3차원 재구성 부피 모델 및 3차원 재구성 표면 모델

2차원 지도를 이용하여 사람 시상하부를 3차원으로 재구성하였다. MEDIP 소프트웨어를 사용하여 두 가지 모델을 제작하였다. 첫 번째는 3차원 재구성 부피 모델로, 모든 voxel이 부피 값을 가지고 있으며 각 구조물을 여러 각도로 회전하고 단면을 생성하여 내부 구조를 확인할 수 있는 모델이다. 두 번째는 3차원 재구성 표면 모델이다. 3차원 재구성 부피 모델의 외곽 면만 재현하는 형식이다. 3D visualization 탭의 투명도 조절을 통해 구조물의 투명도를 조절하며 구조물의 형태와 주행 경로를 3차원적으로 확인할 수 있다.

2. 조직 3차원 재구성 교육 모델

MexhMixer 소프트웨어를 사용하여 시각로 표면모델의 계단 현상과 이상점을 보완한 교육용 모델을 획득하였다[그림 13]. 이 모델은 MeshMixer 소프트웨어가 설치된 모든 PC에서 확인이 가능하다.

3. 조직 3차원 재구성 WebGL 교육 모델

WebGL 주소를 생성하여 접속 및 학습할 수 있는 웹 기반 전체조

직 및 시각로 3차원 재구성 교육모델을 제작하였다. 구조물의 투명도를 10단계로 조절할 수 있으며 배경색의 지정, 회전, 위치이동이 가능하다. 개인 모바일 폰, 태블릿, PC를 이용하여 접속이 가능하며 [그림 14] WebGL 주소는 다음과 같다.

<http://147.47.229.147:8080/STLRendering/190408.html>

고 찰

1. 타 소프트웨어와의 비교

기존 조직 3차원 재구성 소프트웨어는 조직의 외곽 형태를 기반으로 한 자동 정합 기능을 제공하고 있다. 그러나 이 기능은 박절 과정에서 발생하는 조직 접힘, 수축, 팽창, 위치 이탈 등 다양한 변수를 고려하지 못한다는 점에서 한계가 있다. 본 연구에서 대상으로 한 사람 시상하부 조직은 요철이 많은 외형을 지니고 있어 조직 전 처리 과정에서 일부 조직이 탈락하거나 밀리는 현상이 발생하였다. 특히 첫번째 슬라이드에서 시각로에 해당하는 조직의 일부분이 접히고 위치가 이동되었다. 이를 Adobe Photoshop 올가미 툴을 이용하여 수정하고자 하는 조직의 영역을 설정하였고 이동 툴과 변형 툴을 이용하여 원위치로 복구시켰다. 이러한 과정으로 교정된 조직 염색 영상들을 Warp 툴을 이용하여 수동으로 정합 하였다. 다양한 변수에 해당하는 문제점들을 Adobe Photoshop의 여러 툴로 세부 교정하며 누락되는 정보 없이 정합을 실시할 수 있다는 점에서 본 연구는 기존의 자동화된 소프트웨어 사용 연구와 차별성을 보인다.

기존의 조직 영상 기반 소프트웨어는 영상의 음영 대조가 뚜렷한 양상을 고려하여 반자동으로 구역화를 수행하는 기능을 제공한다. 그러나 이는 사람 시상하부와 같이 전체적인 신경세포의 밀도가 높지 않은 구조물의 경우 적용되기 어렵다. 미세한 신경핵의 군집 양상을 육안으

로 구분하기 위해 Adobe Photoshop에서 세부적으로 밝기 값을 조정하고 전 후 슬라이드에 투명도를 준 뒤 구조물의 주행경로를 확인하며 구역화를 진행했다는 점에서 기존 연구와 차별성이 있다. 본 연구는 진행과정을 세분화하여 각 과정에 적합한 별도의 소프트웨어를 적용하고 이들을 서로 호환하며 작업하는 과정을 서술한 것에 의의가 있다.

기존의 조직 3차원 재구성에 활용된 소프트웨어는 복잡한 사용자 인터페이스로 인해 사용법 숙지가 어려웠던 반면 본 연구에서는 일반적으로 많이 사용되는 사용자 친화적 소프트웨어들을 선택하여 이미지 프로세싱의 어려움을 덜었다. 본 연구에 사용된 대부분의 소프트웨어는 무료, 저가 혹은 맞춤형 패키지 구성이 가능하므로 고가의 소프트웨어나 장비 없이 조직 3차원 재구성 영상을 만들 수 있는 방법을 제공하고 있다. 또한 기존의 조직 3차원 재구성 소프트웨어가 고사양의 PC를 요구하는 것에 비해 본 연구에서 사용된 소프트웨어들은 설치에 요구되는 권장사양이 높지 않아 개인 PC에서부터 랩탑까지 다양한 사용자 환경에서 작업이 가능하다는 장점이 있다.

2. 기존의 3차원 재구성 방법론과의 비교

3차원 재구성은 2차원 연속절단면을 촬영하여 얻은 영상에 해부구조의 테두리를 그려서 구역화 하고 적층 하는 과정을 거친다. 이는 미국에서 1994년부터 진행해 온 온몸의 연속절단면영상 (Visible Human Project dataset), 한국에서 2000년부터 발표해 온 온몸 연속절단면영

상(Visible Korean Human dataset)에서 그 예를 찾을 수 있다(황성배 등, 2003). 이들은 육안 구조물을 대상으로 하지만 본 연구와 유사한 진행방식을 가졌다는 점에서 비견할 수 있다.

그러나 기존의 3차원 재구성 연구와 본 연구는 세부적인 과정에서 서로 차별성을 가진다. 온몸 연속절단면영상은 2차원의 연속절단면을 디지털사진기로 촬영한 뒤 A4 종이에 가득 차게 인쇄물로 출력, 색연필로 구조물의 테두리를 그리는 과정을 거쳐 구역화를 진행하였다(황성배 등, 2003). 그러나 본 연구에서는 Axio scan을 통해 얻은 디지털 스캔 영상을 모니터상에서 확인하며 구역화를 진행하였다. 본 연구에서 대상으로 하는 뇌조직의 경우 부분 확대를 통해 신경핵의 미세한 분포양상과 세포체 생김새를 관찰해야 구역화 영역 분류가 가능하기 때문이다. 전술한 연구에서는 구조물의 빛깔을 그대로 간직하고 뚜렷한 외곽을 가진 육안 구조물을 대상으로 하므로 색의 선명도와 대조도가 높아 인쇄매체를 거치더라도 누락되는 정보가 거의 없다. 그러나 본 연구에서 사용된 뇌조직은 한가지 염색법으로 염색된 단일 색상의 조직 연속절단면 영상을 대상으로 하고 있으며 그 내부의 신경핵과 미세구조는 정확한 외곽을 가지지 않는 군집 양상이며 그 밀도가 높지 않으므로 인쇄 매체를 거칠 시 누락되는 정보가 발생할 여지가 있다. 그러므로 영상의 확대, 축소를 통해 신경핵과 미세구조의 세부적인 특징과 전체적인 위치 관계를 모두 고려하며 진행할 수 있는 본 연구의 방식이 조직학을 대상으로 하는 연구에서는 적합할 것으로 생각된다. 이러한 조직 디지털 스캔영상의 구역화에는 펜 형태의 마우스(WacomTM tablet pen)와 판 형태의 태블릿

(WacomTM Intuous pro)을 이용하는 것이 유용하였다. 그리고 온몸 연속절단면은 외곽이 명확하게 구분되는 해부 구조물을 대상으로 하여 자석올가미툴(Magnetic lasso tool)과 빠른선택도구(Quick selection tool)를 이용한 반자동 구역화가 가능하다(황성배 등, 2003). 그러나 본 연구에서 다루는 뇌조직 신경핵은 외곽이 없는 군집 양상을 대상으로 하기 때문에 작업패스(work path tool)를 이용한 수동 구역화로 진행해야 만족스러운 결과물을 얻을 수 있다.

3. 기존의 조직 3차원 재구성 방법론과의 비교

기존의 조직 3차원 재구성 연구는 조직의 획득, 조직의 박절, 조직의 염색, 조직의 디지털화, 조직 영상의 정합, 조직의 3차원 재구성으로 이어지는 공통된 일련의 과정을 공유하고 있다. 기존의 연구들은 각 과정에 최적화된 기능을 제공하는 고가의 기기와 소프트웨어를 사용하여 노동 집약적인 과정을 최대한 신속하고 용이한 방법으로 진행하고자 하였다. Fonyad 등(2015)은 Voloom (microDimensions, Munich, Germany) 소프트웨어를 사용하여 구조물의 구역화와 3차원 재구성을 시행하였다. 또한 Katz 등(2009)은 BioVis3D (BioVis3D, Montevideo, Uruguay) 소프트웨어를 사용하여 남미 물개의 난소 조직을 3차원 재구성하였다. 그러나 동일한 조직 3차원 재구성 과정을 유지하면서도 보다 많은 연구자들이 이를 수행할 수 있도록 하기 위해서는 각 과정에 사용되는 기기와 소프트웨어가

접근성이 높은 것들로 대체되어야 할 필요성이 있다. 따라서 본 연구에서는 고가의 소프트웨어 한 개가 제공하는 기능을 세분화 시키고 이 기능을 대체할 수 있는 여러 개의 소프트웨어-ZEN, Adobe Photoshop, ImageJ, MEDIP, MeshMixer-를 선별하여 각 과정에 맞는 protocol을 제시한다는 점에서 기존 연구와의 차별성이 있다. 또한 영상처리 과정뿐만 아니라 조직 전처리 과정에서 발생하는 변수에도 제시된 소프트웨어들로 교정하는 방식을 구체적으로 제시함으로써 연구자들에게 도움을 주고자 하였다. 여러 개의 소프트웨어를 다뤄야 한다는 점에서 설치 및 인터페이스 숙지에 다소 번거로움이 존재하나 본 연구에서 사용한 소프트웨어는 무료 혹은 저가이거나 데모버전의 다운로드가 용이하다는 점 그리고 일반적인 연구에서 자주 사용되는 소프트웨어라는 점에서 접근성이 높다는 장점이 있다.

그러나 조직 염색 이미지의 3차원 재구성 영상을 만드는 데에는 몇 가지 기술적인 문제가 있었다. 첫번째로 동결절편 제작 시 박절 과정에서 발생하는 뒤틀림 현상을 방지하는 것에 어려움이 있었다. 이는 추후 MRI 데이터와의 정합 과정을 추가하여 교정하고자 한다. 두번째로 별도의 정합 표지점 부재이다. 이는 추후 조직 외곽에 아크릴 물감으로 별도의 표시 혹은 박절이 용이한 재료의 삽입 등을 통해 해결하고자 한다.

Chapter 2.

사람 시상하부의 3차원 재구성

목 차

목 차	53
서 론	55
연구 대상 및 방법	58
1. 조직 확보 및 염색	59
1) 사람 시상하부 조직 확보	59
2) 염색 전 조직 처리	60
3) 염색	60
2. 조직 염색 영상의 디지털화	60
1) 조직 염색 슬라이드 스캔	60
2) 조직 염색 스캔 영상 처리	61
3) 영상 해상도 조절	61
4) 조직 염색 영상 정합	61
5) 조직 염색 영상 폴더 분류	65
3. 구역화를 통한 2차원 지도 제작	65
1) 구역화 영역 레이어 생성 및 Path 제작	65
2) 구역화 영역 면 채우기	66
3) 소실된 조직 염색 슬라이드 영상 수동 보간법 제작	70
4. 3차원 재구성을 위한 2차원 지도 파일 전산 처리	72
1) 전체 레이어 영상 흑백 변환 및 내보내기	72
2) 흑백 영상의 인공물 지우기	72
3) 흑백 영상 내보내기	72
4) 각 구조물 영상 개수 통일	75
5) 흑백 영상의 색상 반전, bit 수 재설정, 확장자 변환	75
5. 3차원 영상 재구성	77
1) Z값 수정 및 전체 구조물 3차원 재구성	77

2) 전체 조직 3차원 재구성 및 뇌후각결질 분리	77
3) 3차원 재구성 영상 좌우 반전	81
4) 생성된 마스크 추출 및 내보내기	81
6. 3차원 교육 모델 제작	81
1) 3차원 재구성 영상 편집	81
2) 교육용 WebGL 생성	82
 결 과	 86
1. 사람 시상하부 조직 염색 영상	86
2. 사람 시상하부 2차원 지도	86
3. 사람 시상하부 3차원 재구성 부피 모델 및 표면 모델	86
4. 사람 시상하부 3차원 재구성 교육 모델	87
5. 사람 시상하부 재구성 WebGL 교육 모델	87
 고 찰	 88
1. Allen brain atlas와의 비교	89
2. MRI 기반 3차원 재구성 모델과의 비교	92
3. 기존 시상하부 교육자료와 비교 및 교육학적 접목 시도	94
 결 론	 95

서론

사람의 시상 하부는 자율신경, 신경내분비, 변연계 및 시신경 시스템의 교차점이자 뇌의 깊은 층에 위치하는 작은 구조물이다(Lemaire 등, 2013). 해부학적으로 봤을 때 시상하부는 다른 뇌 구조물에 비해 상대적으로 크기는 작지만 심혈관 조절, 수면, 신진 대사, 스트레스, 체온 조절, 물과 전해질 균형, 식욕 조절, 성적 행동, 내분비 및 면역 반응을 포함한 중요한 신체 활동 조절 역할을 담당하고 있다. 뿐만 아니라 시상하부는 항상성 조절의 중추이며 생존과 직결된 중요한 구조물이다(Baroncini 등, 2012). 시상하부는 13 개 이상의 신경핵으로 구성되어 있는데 이들은 특정한 지형을 가지고 있으며 서로 기능적으로 연결되어 있다(Marcis 등, 2013). 이러한 시상하부 신경핵의 중요성과 기능적 역할로 인해서 시상하부에 대한 해부학적 구조, 체적, 연결성 및 각 기능을 연구하고자 하는 많은 시도가 있었다(Makris 등, 2013).

지금까지의 시도를 간략히 살펴보면 먼저 2차원 지도를 만드는 연구가 있었다. Baroncini 등(2012)은 20 명 지원자의 관상면에서 관찰된 인간 시상 하부 조직에 조직학과 MRI를 비교 분석하여 구조물 별로 주석을 달았다. 정성 분석 결과 MRI는 방실향, 시상하부의 ventromedial 핵 및 음식 섭취와 에너지 항상성의 조절에 중요한 역할을 하는 뇌파 (아치형) 핵, 뇌 핵 등의 미세한 구조를 강조 할 수 있음을 보여주었으며 확인 된 구조물은 각각은 3차원 공간에 매핑 되었다. Markis 등(2013)은 사람 시상하부와 관련하여 신경학, 정신병학, 내

분비선 및 수면 장애와 성별간 차이를 파악하고자 하는 연구를 수행하였다. 시상 하부를 해부학적 표지점이 되는 구조물에 기초하여 다섯 개의 군으로 세분화하고 7 T 스캐너로 촬영한 뒤 동일한 부위의 조직학 영상과 비교하였다(Makris 등, 2013). 가장 최근에는 Ding 등(2016)이 속한 Allen Institute(Non-profit Bio Science Research Organization)에서 MRI, DWI 및 1,356 대형 포맷 세포 단위의 해상도로 구성된 신경 영상, 고해상도 조직학 및 화학 구조를 통합하는 최초의 디지털 인간 뇌지도를 제시하였다. 박절을 통해 얻은 절편의 조직학 염색 이미지를 함께 제공하고 있으며 117 개의 백색질 영역, 세포 및 화학적으로 정의된 862 개의 구조물에 대한 정보를 제공하고 있다.

사람 시상하부를 3차원으로 재구성하고자 하는 시도도 있었다. Krolewski 등은 시상 하부에서 생성된 신경 활성 물질들의 발현 양상을 2-D 및 3-D 이미지로 생성하고 시상 하부의 핵에서 이러한 물질에 대한 유전자의 발현을 시각적으로 정렬 및 정량화 하기 위해 전통적인 조직학 기법과 하이브리드 화 조직 화학을 결합하는 연구를 수행한 바 있다(Krolewski 등, 2010). Lemaire 등의 연구에서는 시상 하부의 특정 핵과 백색질을 표적으로 삼아 인간의 시상 하부의 관련 지형 데이터를 종합하였고 정교한 MRI 기반 3차원 지도를 작성하였다(Lemaire 등, 2013). 또한 Gabery 등은 MRI와 PET(양전자 방출 단층 촬영)의 voxel 기반 형태 측정법을 사용하여 헌팅턴 병의 초기 단계에서 시상 하부의 병리학적 변화를 입증하였다. 이 연구에서 헌팅턴 병 증상에 있어 시상 하부 기능 장애가 이 부위의 부피와 관련이 있는

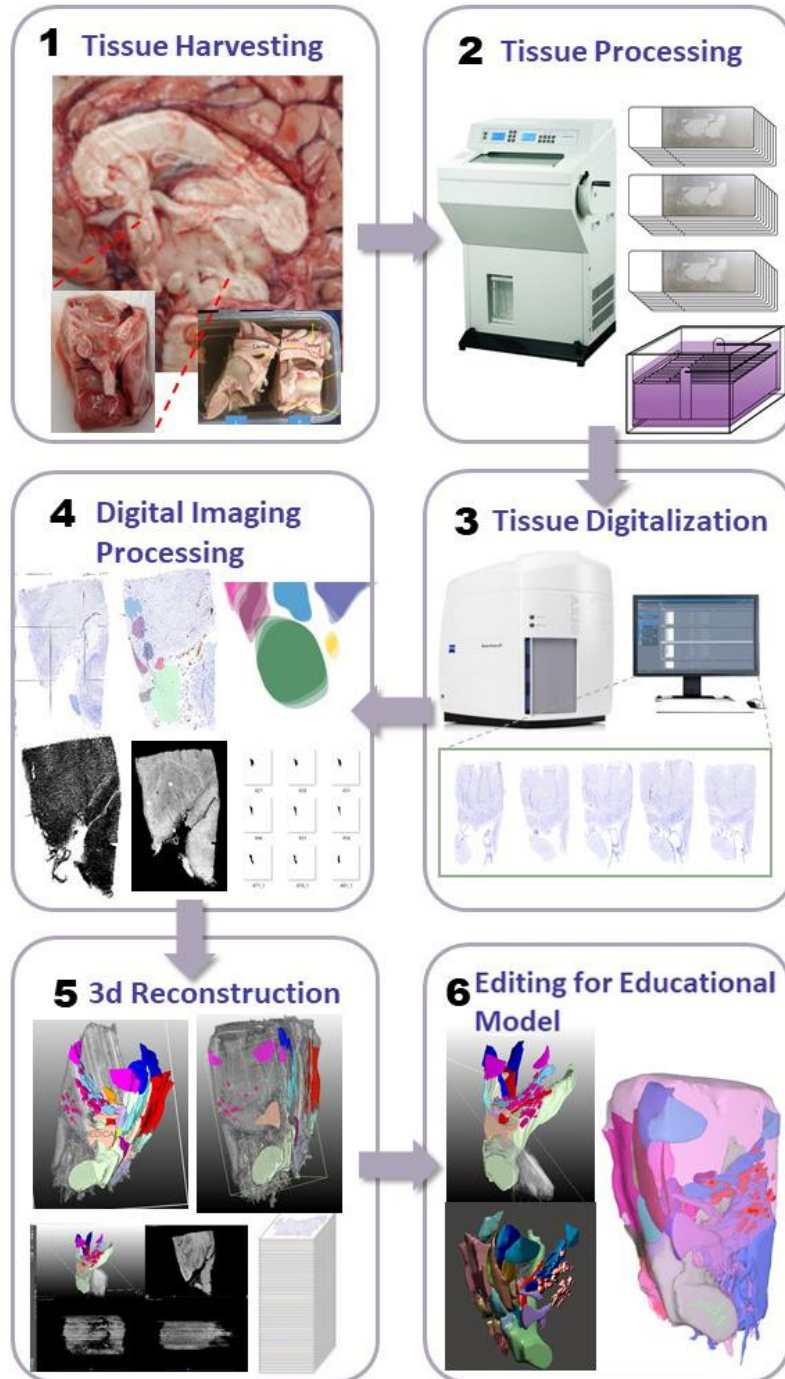
지 확인하기 위해 MRI에서 시상 하부 영역을 구역화 하고 3차원으로 재구성한 뒤 부피를 측정하는 방법을 확립하였다(Gabery 등, 2015).

전술 한 연구들은 사람 시상하부 연구에 있어 의미 있는 결과를 제시해 주지만 몇 가지 개선되어야 할 부분이 존재한다. Allen Institute의 사람 뇌 지도는 2차원 염색 이미지를 바탕으로 작성되어 있고 3차원 사람 뇌 지도는 제공하고 있지 않다. 따라서 각 핵의 위치 관계 및 미세 신경구조를 공간지각적으로 이해하는 데 많은 연구자들이 어려움을 겪고 있다. 또한 현재 보고된 대부분의 사람 시상하부 3차원 지도는 MRI 데이터를 기반으로 작성되어 있으므로 적은 수의 구조물에 대한 정보를 제공하기 때문에 연구자들이 신경핵 단위의 상세한 미세구조를 파악하는 것이 어렵다(Baroncini 등, 2012).

이러한 단점들을 극복하기 위하여 본 연구에서는 지금까지 보고된 바 없는 조직학 영상 기반의 사람 시상하부의 3차원 지도를 Chapter 1에서 정립한 방법을 적용하여 개발하고자 하였다.

연구 대상 및 방법

본 연구의 진행 순서 및 작업공정은 그림 15에 요약하였다.



[그림 15] 전체 과정 공정도

1. 조직 확보 및 염색

1) 사람 시상하부 조직 확보

본 연구를 수행하기 위해 서울대학교 의과대학 법의학교실에서 사망한지 48시간이 되지 않은 시신의 뇌 시상하부 조직을 제공받았다. 부검된 인간 표본의 채취 및 분석은 윤리위원회(IRB: Institutional Review Board)의 면제 승인을 받았고(2018-004), 부검을 수행하기 위한 표준 수술 절차에 따라 서울대학교 의학과 법의학교실 (서울, 대한민국) 공인 직원이 수행했다. 본 연구에 사용된 뇌 기증자는 생전에 진단된 신경학적 질환이 없었으며 나이는 41세, 키는 178 cm, 몸무게는 77 kg, 성별은 남성이었고 사인은 의사(hanging)였다.

조직 채취는 경질막(dura mater)과 척수(spinal cord)가 제거된 상태로 법의관에게 전달받은 뒤 자체적으로 시행되었다. 부검에는 뇌도와 블레이드를 사용하였다. 세로틈새(longitudinal fissure)의 정중선을 따라 절개하여 뇌를 양쪽 반구로 분리한 뒤 안쪽면(시상면)에서 표지점이 되는 구조물들을 관찰하며 범위를 측정하였다. 왼쪽 시상하부를 약 1 cm X 1.5 cm X 1 cm 크기로 시료 수집하였다. 조직 채취 전에 시상하부의 범위가 온전히 포함될 수 있도록 표지점이 되는 구조물들을 정하고 이들을 관통하는 가상의 선을 그어보았다. 앞-뒤 경계는 시각맞교차(optic chiasm)와 뇌활기둥(columns of fornix)으로 하였고, 위아래 기준은 앞맞교차(anterior commissure)와 시각맞교차로 하였다.

2) 염색 전 조직 처리

부검을 통해 획득한 사람 시상하부 조직은 3차 증류수로 세척한 뒤 4% PFA(paraformaldehyde) 용액에 침지 시켜 4℃에서 일주일간 고정시켰다. 그 후 고정액의 세정 및 치환조작을 위해 조직을 순차적으로 4℃에서 10%, 20%, 30% sucrose/0.1 M PBS에 각 24시간 침지시킨 뒤 건조되지 않도록 호일로 밀봉하여 -80℃에 보관하였다. 얼린 조직은 cryostat를 사용하여 -20℃에서 20 μm 두께로 박절한 뒤 2% 젤라틴 코팅 슬라이드에 부착시켰다. 샘플이 부착된 슬라이드는 염색 전까지 슬라이드 박스에 넣어 -80℃ 냉동고에 보관하였다.

3) 염 색

총 500장의 절편 중 100장의 절편(샘플링 간격 100 μm)이 분석에 사용되었다. 모든 절편은 실온에서 24시간 건조시킨 뒤 PBS에 침지 시켜 6분간 세척, Cresyl violet 용액(cresyl violet acetate, 0.05 g; DW, 50 ml; glacial acetic acid, 0.15 ml)에 10분간 반응시켜 염색하였다. 염색한 슬라이드는 3차증류수에 침지 시켜 shaker 위에서 5분간 세척한 후 다시 100% ethanol에 6분간 반응시켰다. 반응이 끝난 슬라이드는 xylene에 10분간 침지시킨 뒤 봉입 하였다.

2. 조직 영상의 디지털화

1) 조직 염색 슬라이드 스캔

염색이 끝난 100장의 조직 슬라이드는 ZEISS Axio Scan.Z1을 사

용하여 20X 배율로 스캔하였다. 스캔 조건은 연결된 PC에 설치된 ZEN2.3lite (ZEISS) 소프트웨어를 사용하여 설정하였다. 스캔 영역을 설정할 때 Open tissue detection wizard 탭의 히스토그램을 조정하여 조직이 있는 영역을 감지하였다. 뚜렷한 염색 양상을 보이는 영상은 자동화 기능을 이용하여 진행하였고 염색 양상이 불분명한 영상은 수동으로 영역을 추가하였다. 스캔을 완료한 뒤 Carl Zeiss Image (*.czi) 확장자로 저장하였다.

2) 조직 염색 스캔 영상 처리

스캔 된 영상은 ZEN2.3lite 소프트웨어에서 편집하였다. 조직 내부의 신경핵과 미세구조가 잘 구분되도록 히스토그램 값을 조정하여 시료영상의 대조도를 높여주었다. 이를 통해 추후 구조물 구역화 과정이 수월하게 진행되었다. 이 후 모든 슬라이드 스캔 영상은 JPEG 확장자로 변환하였고 영상 크기 재설정을 통해 용량을 축소한 뒤 내보내기 하였다.

3) 영상 해상도 조절

내보내기 한 조직 염색 영상을 정합하기 위해 먼저 각 영상의 해상도를 Adobe Photoshop CC를 사용하여 낮춰주었다. 이 후 저장된 영상들을 한 폴더에 정리하여 확인이 가능하도록 하였다[그림 16].

4) 조직 염색 영상 정합

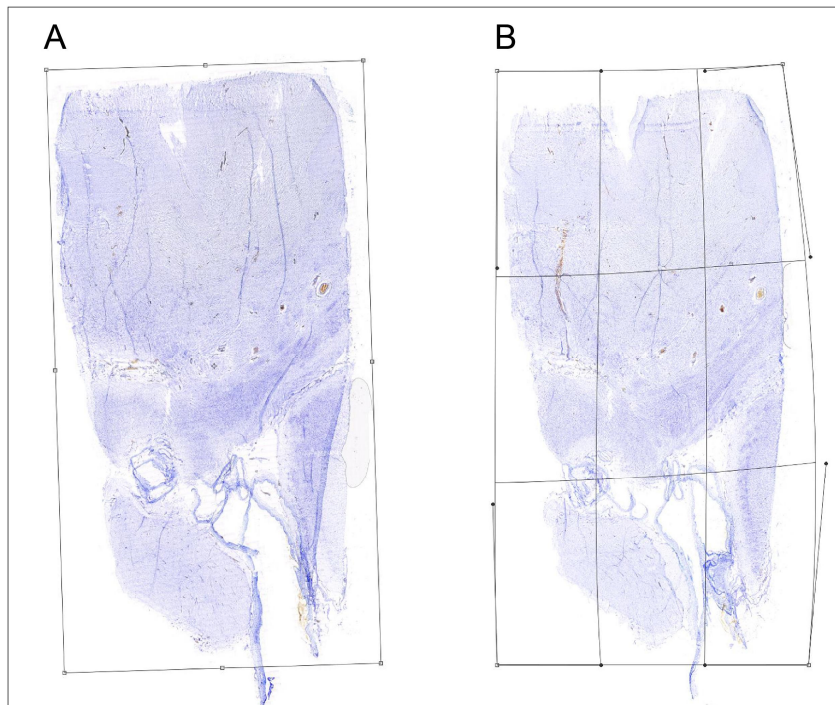
추후 구조물 구역화 및 재구성 과정을 실시하기 위해 정합을 수행

하였다. Adobe Photoshop CC에서 첫번째 조직 슬라이드 영상을 open 한 뒤 후속 영상들을 모두 같은 파일로 불러오기 하였다. 이 과정을 통해 하나의 PSD (Photoshop document: Adobe Photoshop 문서의 파일 형식) 파일에 전체 조직 영상이 각 레이어로 포함될 수 있도록 하였다.

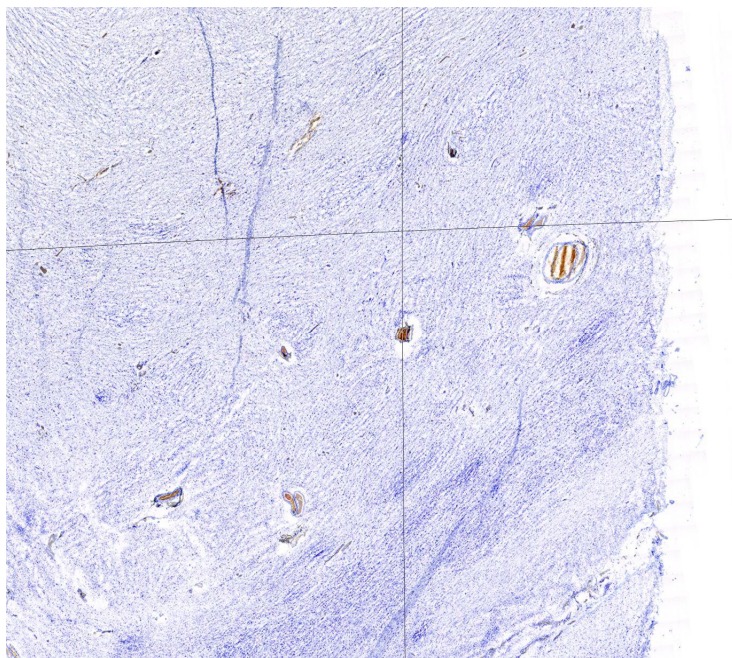
연속되는 전 후 조직 영상 레이어의 투명도를 조절하며 구조물 및 표지점의 위치관계를 파악, 정합을 실시하였다[그림 17]. 표지점으로 삼은 구조물들은 미세혈관, 시각로, 뇌활, 안쪽후각겉질, 조직의 외곽선이었다[그림 18]. 전 후 조직 영상을 동시 확인하며 Scale과 Warp 툴을 사용해 형태 교정 및 위치 정합을 실시하였다[그림 17, 18]. Scale 툴은 대략적인 전체 조직의 크기를 동일하게 교정하는데 사용되었고 Warp 툴은 수축, 팽창의 정도가 다른 조직 영상의 형태를 교정하는데 사용되었다. Transform 툴은 조직 전체의 위치 교정 및 세부 구조 위치 이탈을 교정하는데 사용되었다. 시각로와 안쪽후각겉질의 위치 이탈 현상이 3개의 슬라이드에서 관찰되었고 교정되었다.



[그림 16] Photoshop에서 해상도 조정 후 번호 순 정리 된 조직 염색 슬라이드 영상



[그림 17] Photoshop에서 Warp 툴을 이용하여 정합하는 과정. A: Transform 툴을 이용하여 조직 전체의 위치를 교정하는 모습, B: Warp 툴을 이용하여 조직의 수축, 팽창을 교정하는 모습.



[그림 18] Photoshop에서 미세혈관과 조직 가장자리를 기준으로 정합하는 과정

5) 조직 염색 영상 폴더 분류

정합이 완료된 PSD 파일은 각 레이어 영상을 JPEG 확장자로 내보내기 한 뒤 동일한 폴더 안에 포함시켰다.

3. 구역화를 통한 2차원 지도 제작

1) 구역화 영역 레이어 생성 및 Path 제작

Allen human brain atlas(atlas.brain-map.org)를 참고하여 각 조직염색 슬라이드 영상에 신경핵과 미세구조물들의 영역을 구역화 하였다. Allen institute는 비영리 의료 연구 기관으로 신경과학 분야의 연구 데이터를 전 세계에 공유하고 있다. 여기서 제공하는 총 106장의 사람 뇌 염색 슬라이드 영상 중 22-42번 범위에 해당하는 영상이 시상하부 영역이었다. 해상도와 길이 값, 염색 영상의 형태적 유사성을 고려하며 Allen atlas를 참고하여 구역화 과정을 수행하였다.

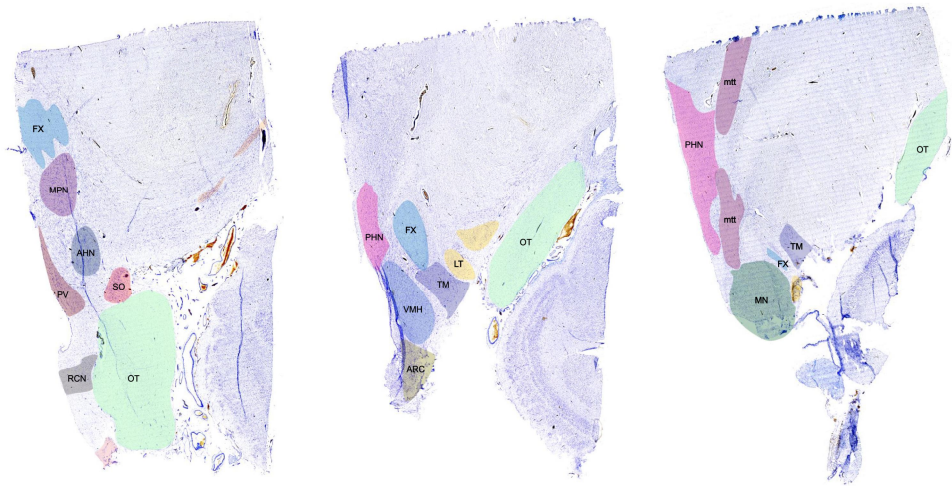
Allen brain atlas와 본 연구의 조직 염색 슬라이드 영상은 매우 유사한 염색 양상을 보이는 부분도 있었고 상이한 부분도 있었다. 유사성이 높은 신경핵과 미세구조물은 시각로, 뇌활, 유두핵(MN: mammillary nucleus), 앞맞교차, 시각로위핵(SO: supraoptic nucleus)이었으며 유사성이 낮지 않은 신경핵과 미세구조물은 용기유두핵(TM: tuberomammillary nucleus), 가쪽용기핵(LT: lateral tuberal nuclei), 대각섬유줄핵(NDB: nucleus of diagonal band) 등이었다. 염색 양상이 뚜렷하며 유사성이 높은 구조물인 시각로, 시각로위핵, 뇌활 순으로 구

역화를 진행하였다. 유사성이 높지 않는 구조물은 동일한 영역의 Allen brain atlas 영상을 참고하여 영역을 유추하며 진행하였다. 특히 가쪽융기핵의 경우 본 연구의 슬라이드 영상에서는 구분이 되지 않았다. 따라서 명확히 구분되는 구조물인 시각로와 뇌활의 구역화를 먼저 수행한 뒤 뒤시상하부핵(PHN: posterior hypothalamic nucleus), 활꼴핵(ARC: arcuate nucleus), 배쪽안쪽핵(VMH: ventromedial hypothalamic nucleus), 융기유두핵, 가쪽융기핵 순으로 유추해 나가며 구역화를 수행하였다.

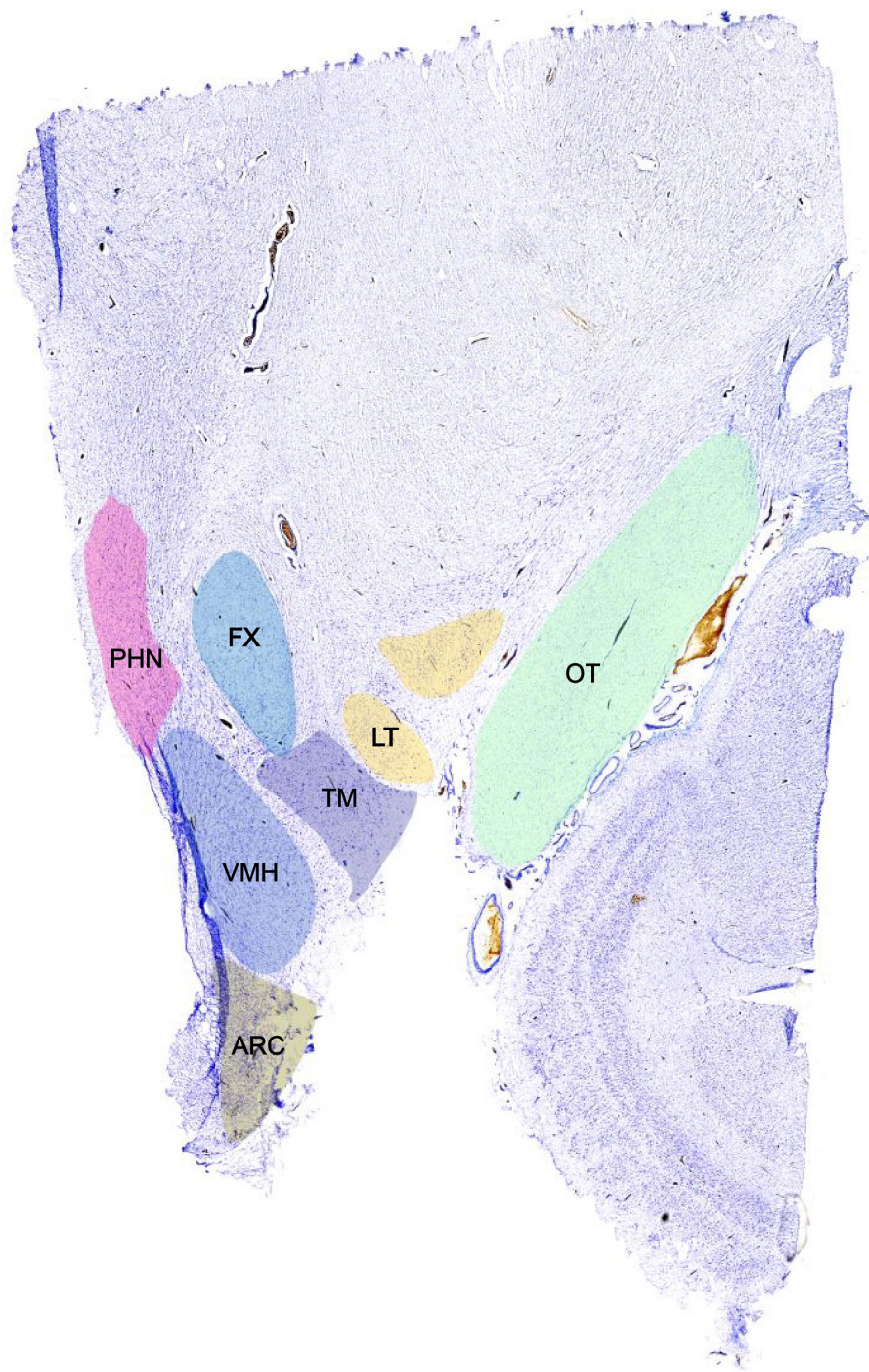
각 조직 염색 슬라이드 영상은 레이어 탭에 동일한 명칭으로 폴더를 만들고 각 미세구조물에 해당하는 종속 레이어를 생성하였으며 이는 ‘슬라이드 숫자_구조물 명칭’으로 하였다. 각 레이어에서 path 툴을 사용하여 해당 구조물의 영역을 그려 나갔다.

2) 구역화 영역 면 채우기

Path 툴로 구조물의 구역화 영역을 그린 뒤 선택영역으로 활성화시켰다. 그 후 원하는 색상을 설정한 뒤 면에 빗깇을 채워 넣었다[그림 19]. 위의 과정으로 총 23개의 구조물에 해당하는 구역화를 수행하였다[표 1].



[그림 19-1] Photoshop을 이용하여 제작한 사람 시상하부 2차원 구역화 지도. OT, optic tract; RCN, retrochiasmatic nucleus; FX, fornix; MP, medial preoptic nucleus; AHN, anterior hypothalamic nucleus; SO, supraoptic nucleus; PV, paraventricular nucleus of hypothalamus; PHN, posterior hypothalamic nucleus; VMH, ventromedial hypothalamic nucleus; TM, tuberomammillary nucleus; LT, lateral tuberal nuclei; ARC, arcuate nucleus of hypothalamus; mtt, mammillothalamic tract; MN, mammillary nucleus.



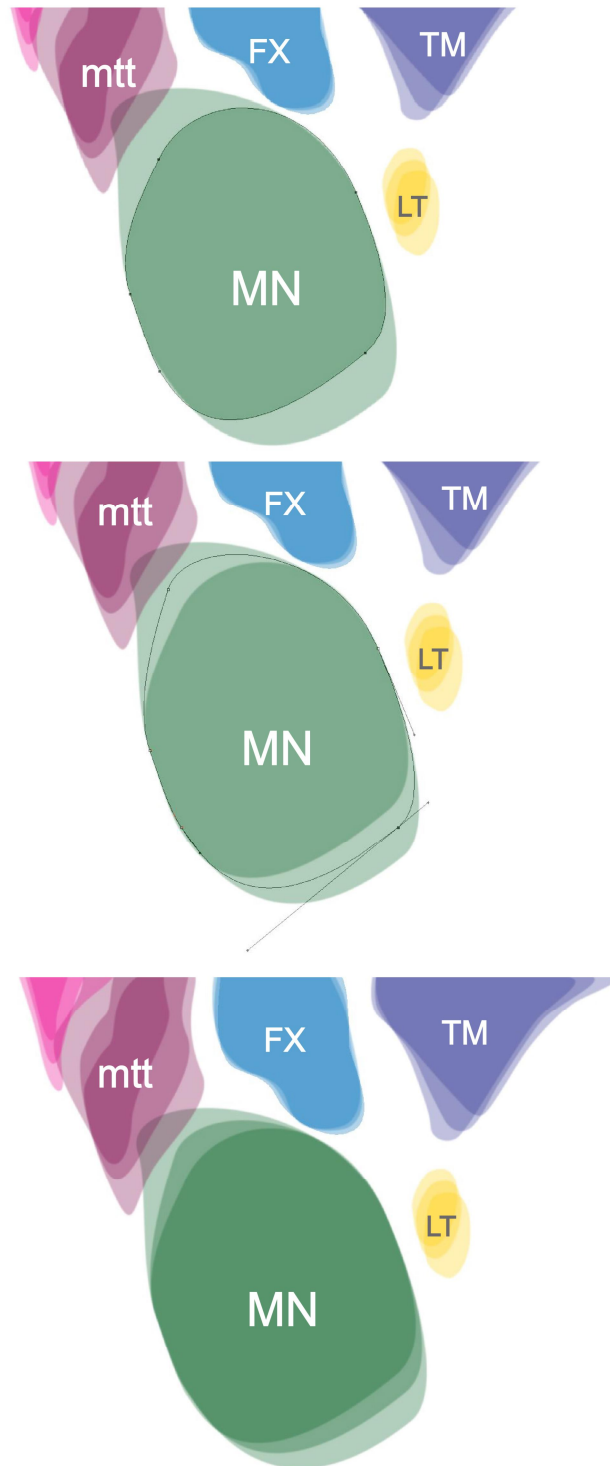
[그림 19-2] Photoshop을 이용하여 제작한 사람 시상하부 2차원 구역화 지도.
 OT, optic tract; FX, fornix; PHN, posterior hypothalamic nucleus; VMH, ventromedial hypothalamic nucleus; TM, tuberomammillary nucleus; LT, lateral tuberal nuclei; ARC, arcuate nucleus of hypothalamus.

[표 1] 구역화 한 구조물들의 명칭

약어	원명칭	구역화 된 레이어 수
AC	Anterior commissure	19
AHN	Anterior hypothalamic nucleus	13
ARC	Arcuate nucleus of Hypothalamus	39
BNM	Basal nucleus of meynert	23
DMH	Dorsal hypothalamic nucleus	22
FX	Fornix	80
LHsc	Accessory secretory cells of lateral hypothalamus	13
LT	Lateral tuberal nuclei	49
ME	Medial eminence	29
MN	Mammillary nucleus	30
TM	Tuberomammillary nucleus	54
UnN	Uncinate nucleus	2
MPN	Medial preoptic nucleus	12
Mtt	Mammillothalamic tract	29
NDB	Nucleus of diagonal band	25
OT	Optic tract	100
PHN	Posterior hypothalamic nucleus	43
RCN	Retrochiasmatic nucleus	18
PV	Paraventricular nucleus of hypothalamus	33
SCN	Suprachiasmatic nucleus	11
SI-pc	Lightly stained parvocellular islands of Substantia innoninate	17
SO	Supraoptic nucleus	37
VMH	Ventromedial hypothalamic nucleus	36

3) 소실된 조직 염색 슬라이드 영상 수동 보간법 제작

조직 접힘, 탈락으로 소실된 11장의 슬라이드를 수동 보간법 (manual interpolation)으로 제작하였다. 소실된 슬라이드는 61번, 306번, 316번, 321번, 381번, 386번, 391번, 396번, 431번, 436번, 466번 슬라이드였다. 먼저 소실된 슬라이드의 숫자와 동일한 폴더를 만들고 순서에 맞게 정렬하였다. 그 후 소실된 슬라이드의 앞, 뒤의 구역화 레이어를 가시화 시킨 뒤, 소실된 슬라이드의 수만큼 길이 값을 등분하여 구역화 영역을 제작했다[그림 20]. 이 과정을 통해 총 108개의 상위 폴더를 얻을 수 있었다.



[그림 20] Photoshop의 Path 툴을 이용한 수동 보간법 제작 과정. FX, fornix; TM, tuberomammillary nucleus; mtt, mammillothalamic tract; MN, mammillary nucleus.

4. 3차원 재구성을 위한 2차원 지도 파일 전산 처리

1) 전체 레이어 영상 흑백 변환 및 내보내기

3차원 재구성 소프트웨어에는 흑백 마스크의 이미지가 사용되므로 Adobe Photoshop CC에서 모든 폴더 이미지들을 흑백으로 변환시킨 뒤 JPEG 확장자로 내보내기 하였다[그림 21, 22]. 변환된 흑백 영상들은 추후 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 배경색과 전경색을 반전시켜 주었다.

2) 흑백 영상의 인공물 지우기

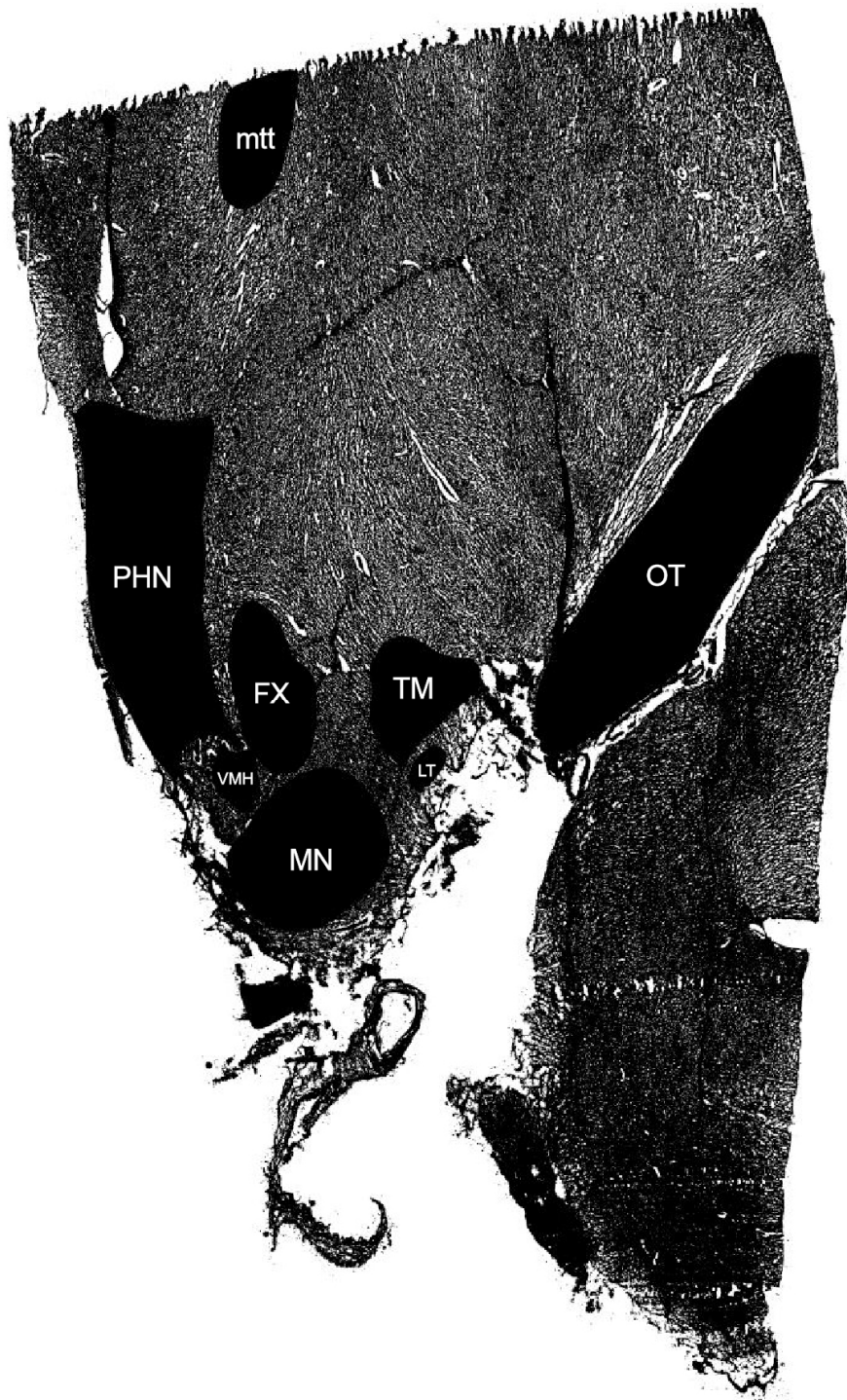
슬라이드 제작 시 붓입 과정에서 발생하는 불필요한 인공물들을 영상에서 제거하여 추후 3차원 재구성 과정에 용이하도록 하였다.

3) 흑백 영상 내보내기

3차원 재구성 모델을 제작할 때 적용이 용이하도록 구조물 별로 폴더를 따로 만들고 그 안에 해당 흑백 영상들을 저장하였다. 총 24개의 폴더를 만들고 그 안에 각 구조물에 해당하는 영상을 저장하였다[그림 23].



[그림 21] Photoshop에서 흑백 전환 후 내보내기 한 조직 영상들



[그림 22] Photoshop에서 흑백 변환한 조직과 구조물 영상. OT, optic tract; FX, fornix; PHN, posterior hypothalamic nucleus; VMH, ventromedial hypothalamic nucleus; TM, tuberomammillary nucleus; LT, lateral tuberal nuclei; ARC, arcuate nucleus of hypothalamus.

4) 각 구조물 영상 개수 통일

3차원 재구성 소프트웨어를 사용 시 ImageJ에서 제작한 각 구조물 마스크를 일정한 규격으로 구성하기 위해 구조물의 영상 수를 모든 동일하게 맞춰주었다. 영상의 수는 전체 조직 영상 100장과 맨 앞장 빈 레이어 1장, 그리고 맨 뒷장 빈 레이어 1장을 포함하여 총 102장으로 제작하였다. 가장 많은 수의 구역화 레이어를 가지는 구조물은 시각로(총 100장)였으며, 가장 적은 수의 구역화 레이어를 가지는 구조물은 갈고리핵 (UnN: Uncinate nucleus)(총 2장)이었다.

5) 흑백 영상의 색상 반전, bit 수 재설정, 확장자 변환

3차원 재구성 소프트웨어의 파일 처리를 위해 다음의 과정들을 수행하였다. ImageJ에서 전체 영상의 흑백 반전을 시행하였다. 이 후 3차원 재구성 소프트웨어가 원활히 구동될 수 있도록 파일 크기를 1/10로 축소해 주었다. 조직 전체 영상에 해당하는 마스크는 16bit로, 각 구조물에 해당하는 마스크들은 8bit로 변환하였다. 마지막으로 전체 조직은 NIFTI-1(전체), 각 구조물은 Raw data(mask)로 확장자를 변경해 주었다.



[그림 23] ImageJ에서 흑백 반전, 크기 재설정, 확장자 변환하여 폴더안에 저장한 시각로 영상들

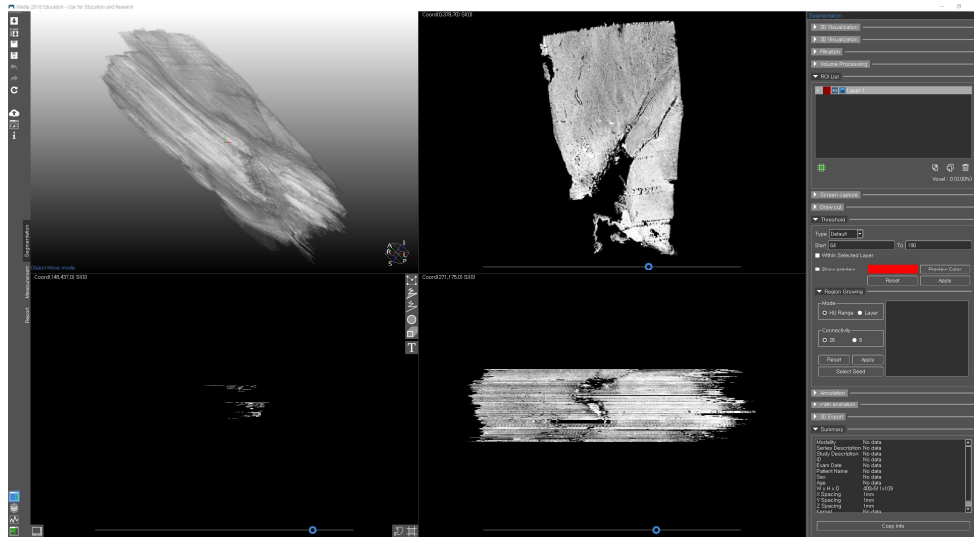
5. 3차원 영상 재구성

1) Z 값 수정 및 전체 구조물 3차원 재구성

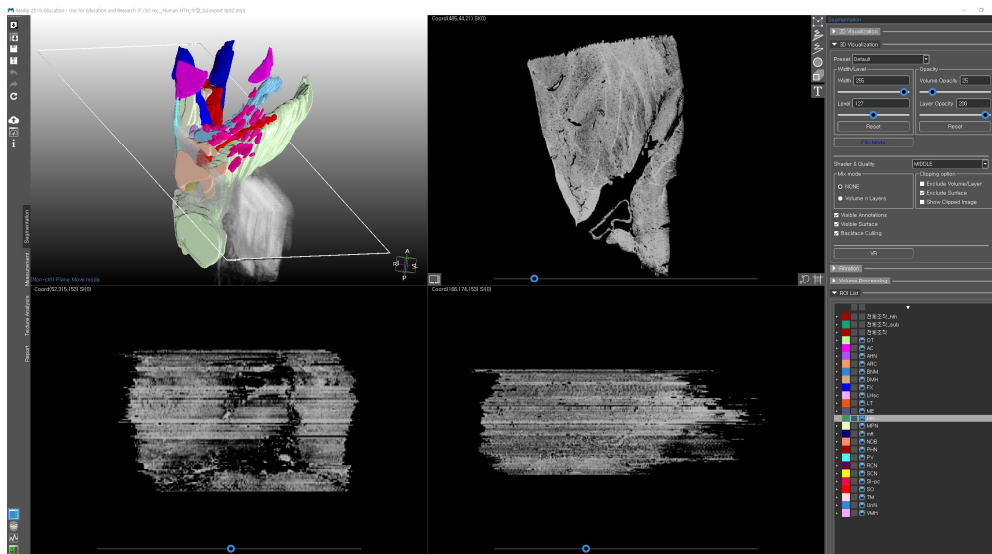
3차원 영상 재구성에는 MEDIP 소프트웨어를 사용하였다. Open 탭에서 NIFTI-1 확장자 원본영상 파일을 선택하여 조직 전체 영상을 불러왔다[그림 24]. 이 후 23개의 구조물 Raw data를 한 모두 불러오기 하여 한 파일에 포함시키고 3차원 재구성 부피 모델을 제작하였다[그림 25, 26].

2) 전체 조직 3차원 재구성 및 안쪽후각겉질 분리

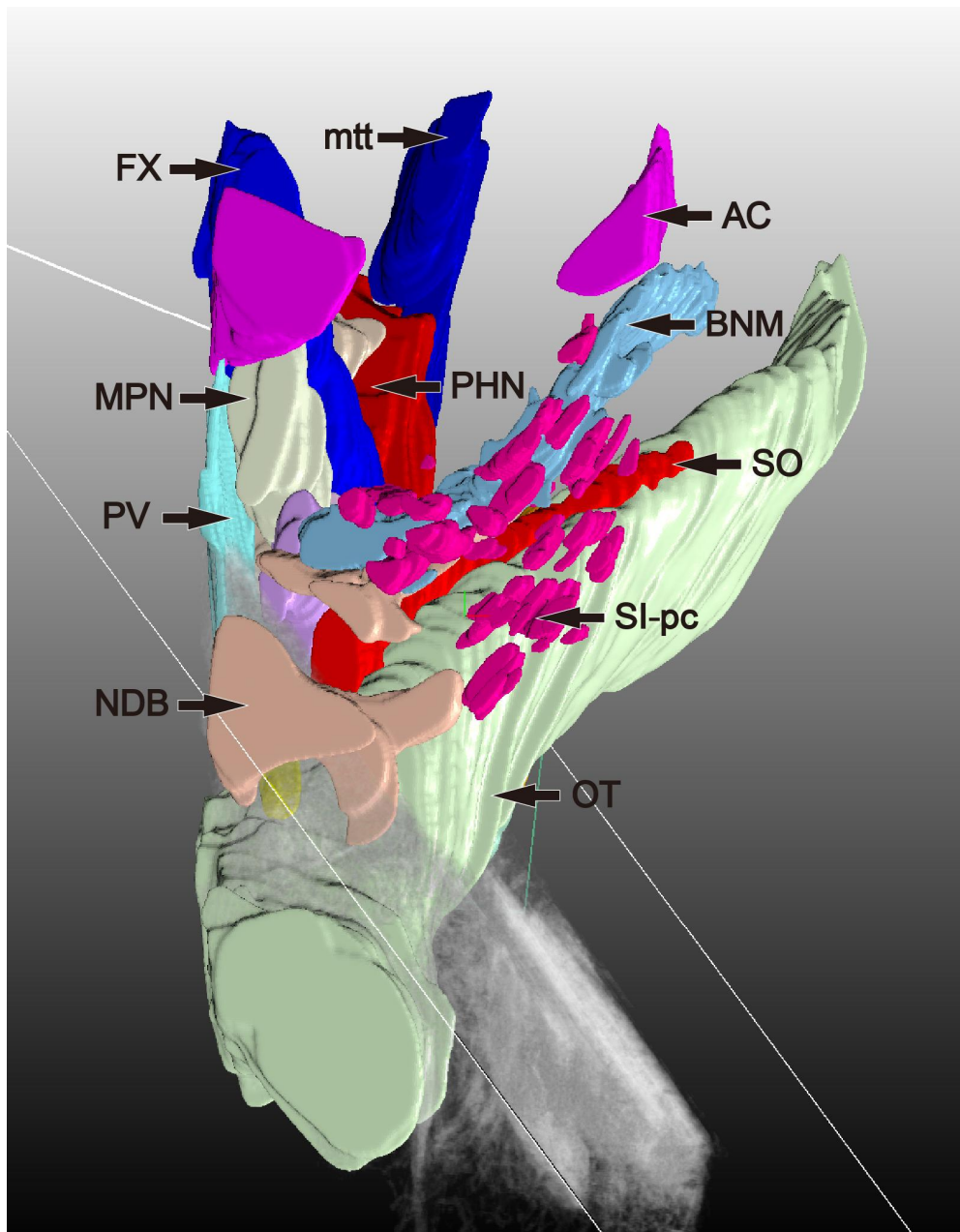
시상하부 영역을 명확히 지정하기 위해 안쪽후각겉질에 해당하는 영역을 별도로 구분하였다. 먼저 전체 조직을 3차원 재구성하는 과정을 수행하였다. Threshold 탭에서 ROI 히스토그램 값을 조정한 뒤 Apply를 수행하여 전체 조직을 3차원 재구성하였다. 이 후 안쪽후각겉질에 해당하는 영역을 추출해내기 위해 전체 조직 레이어를 복제한 뒤 Axial view에서 안쪽후각겉질 영역을 수동으로 삭제하였다. 이 과정을 전체 영상에 적용하여 시상하부만의 마스크 영역을 추출하였다. 그리고 $\text{First} = \text{First} - \text{second}$ 를 사용하여 전체 조직 마스크에서 시상하부 마스크 영역을 차집합 연산을 적용, 안쪽후각겉질만의 마스크 영역을 추출하였다[그림 27].



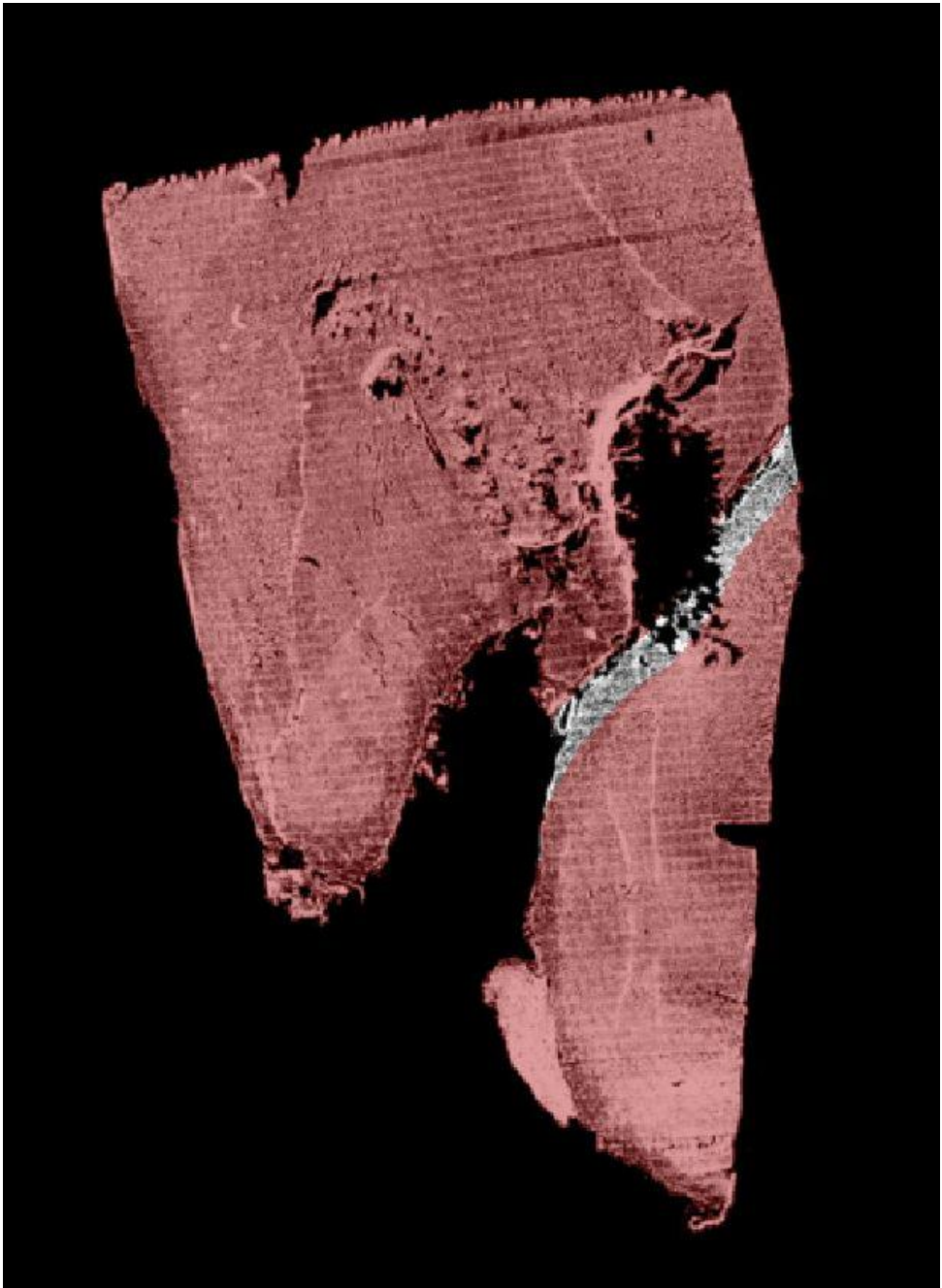
[그림 24] MEDIP 소프트웨어로 불러오기 한 전체 조직 영상



[그림 25] MEDIP 소프트웨어로 제작한 3차원 재구성 부피모델



[그림 26] MEDIP 소프트웨어로 재구성 한 미세구조물 3차원 재구성 부피모델.
 OT, optic tract; FX, fornix; MPN, medial preoptic nucleus; SO, supraoptic
 nucleus; PV, paraventricular nucleus of hypothalamus; PHN, posterior
 hypothalamic nucleus; mtt, mamillothalamic tract; AC, anterior commissure;
 BNM, basal nucleus of Meynert; NDB, nucleus of diagonal band.



[그림 27] MEDIP 소프트웨어를 이용한 시상하부와 안쪽후각결질 분리 과정

3) 3차원 재구성 영상 좌우 반전

MEDIP의 기본 설정으로 조직을 3차원 재구성하면 좌우가 반전된 영상이 만들어지므로 이를 교정하는 작업을 수행하였다. Volume processing 탭에서 Z-flip 기능을 두 차례 수행하여 이를 교정하였고 이를 모든 구조물 레이어에 적용하였다.

4) 생성된 마스크 추출 및 내보내기

생성된 모든 구조물의 3차원 재구성 부피모델은 추후 교육용 모델로 편집하기 위해 3차원 재구성 표면 모델로 변환하였다. 교육용 3차원 재구성 모델은 표면 계단현상을 최소화하여 매끄럽게 처리하여 것이 목표이므로 이 과정에서 smoothing 기능을 최대한 활용하였다. 각 구조물에 해당하는 레이어를 선택하고 3D export 탭의 smoothing 값을 200-300으로 설정한 뒤 preview surface를 수행하여 23개의 표면 모델을 추출하였다. 이 후 모든 구조물 표면 모델은 STL 확장자로 변환하여 내보내기 하였다.

6. 3차원 교육 모델 제작

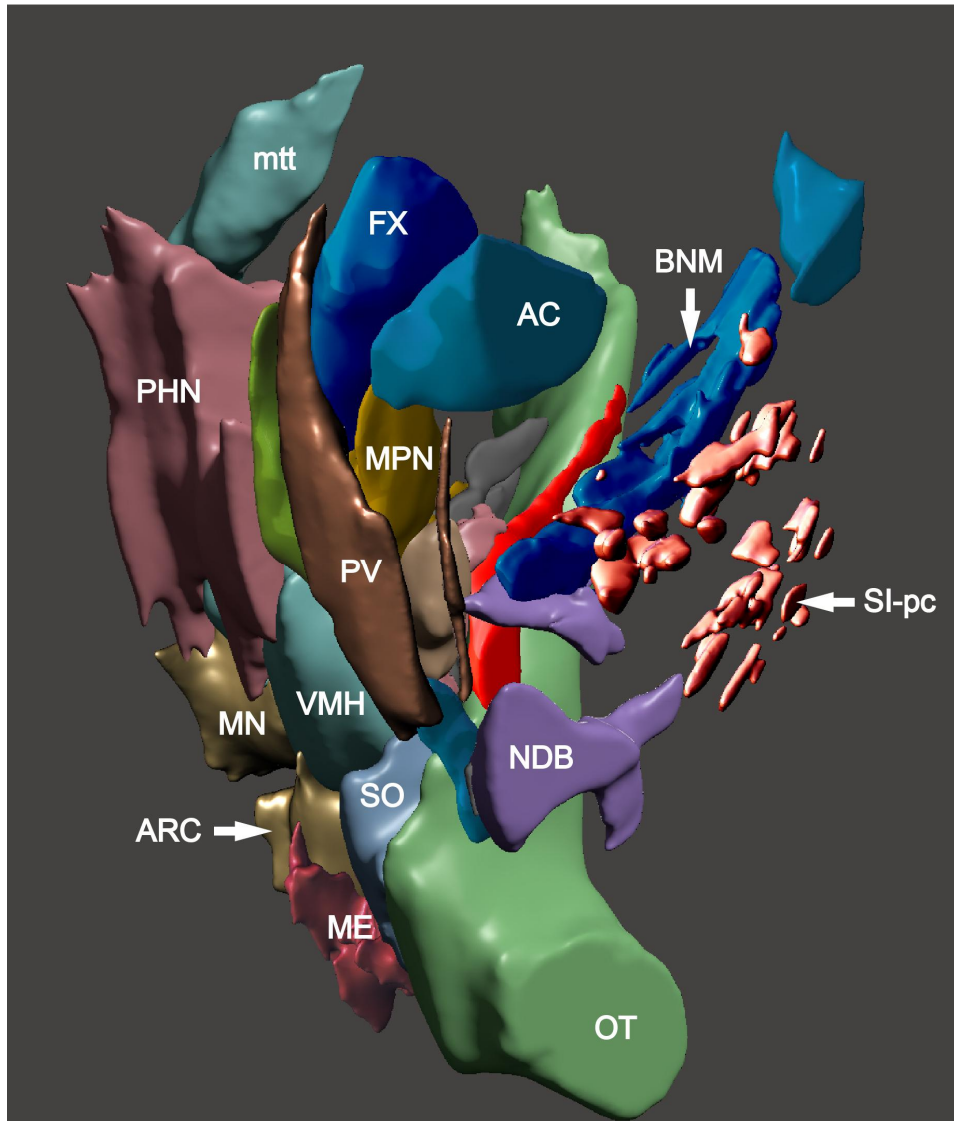
1) 3차원 재구성 영상 편집

교육용 모델을 제작하기 위해 MeshMixer를 사용하여 계단현상 완화, 이상점(outlier) 조정을 수행하였다. 23개의 구조물 표면모델을 불러오기 한 뒤 Sculpt 탭의 Brush를 활용하여 표면의 계단현상을 완

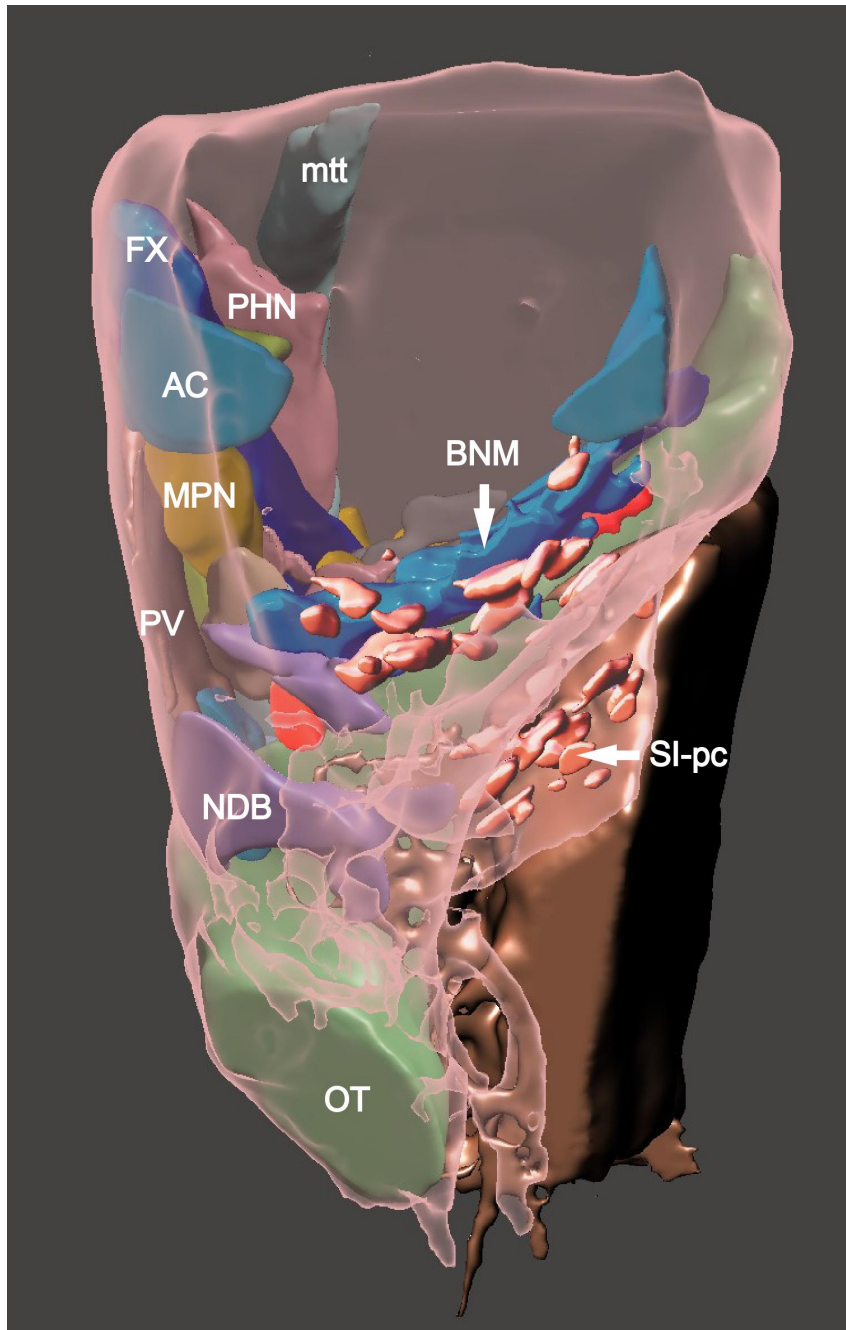
화하였다. 또한 이상점(outlier)으로 보이는 형태는 해부학적 구조를 고려하여 과감히 삭제, 합리적인 재조정의 과정을 거쳐 정리하였다[그림 28]. 특히 활꼴융기 (medial eminence), 가쪽유두핵, 보조분비세포 (LHsc: Accessory secretory cells of lateral hypothalamus)는 구조물 외곽형태 변이가 심한 구조물이었다. 따라서 기존의 2차원 시상하부 교육자료와 육안구분이 가능한 해부학적 구조물을 참고로 하여 재조정 과정을 수행하였다. 활꼴융기는 ‘7일간의 신경해부학 실습(신 등, 2019)’에서 제시하고 있는 일반적인 사람 시상하부 외곽의 형태를 참고로 하며 형태를 수정하였고 가쪽유두핵과 보조분비세포는 위치이탈과 계단현상이 심한 전체적인 형태를 부드럽게 이어주는 방식으로 제작하여 주행경로와 위치관계를 파악할 수 있도록 제작하였다. 제작한 23개의 구조물은 STL 확장자로 내보내기 한 뒤 각 구조물 명칭으로 저장하였다.

2) 교육용 WebGL 생성

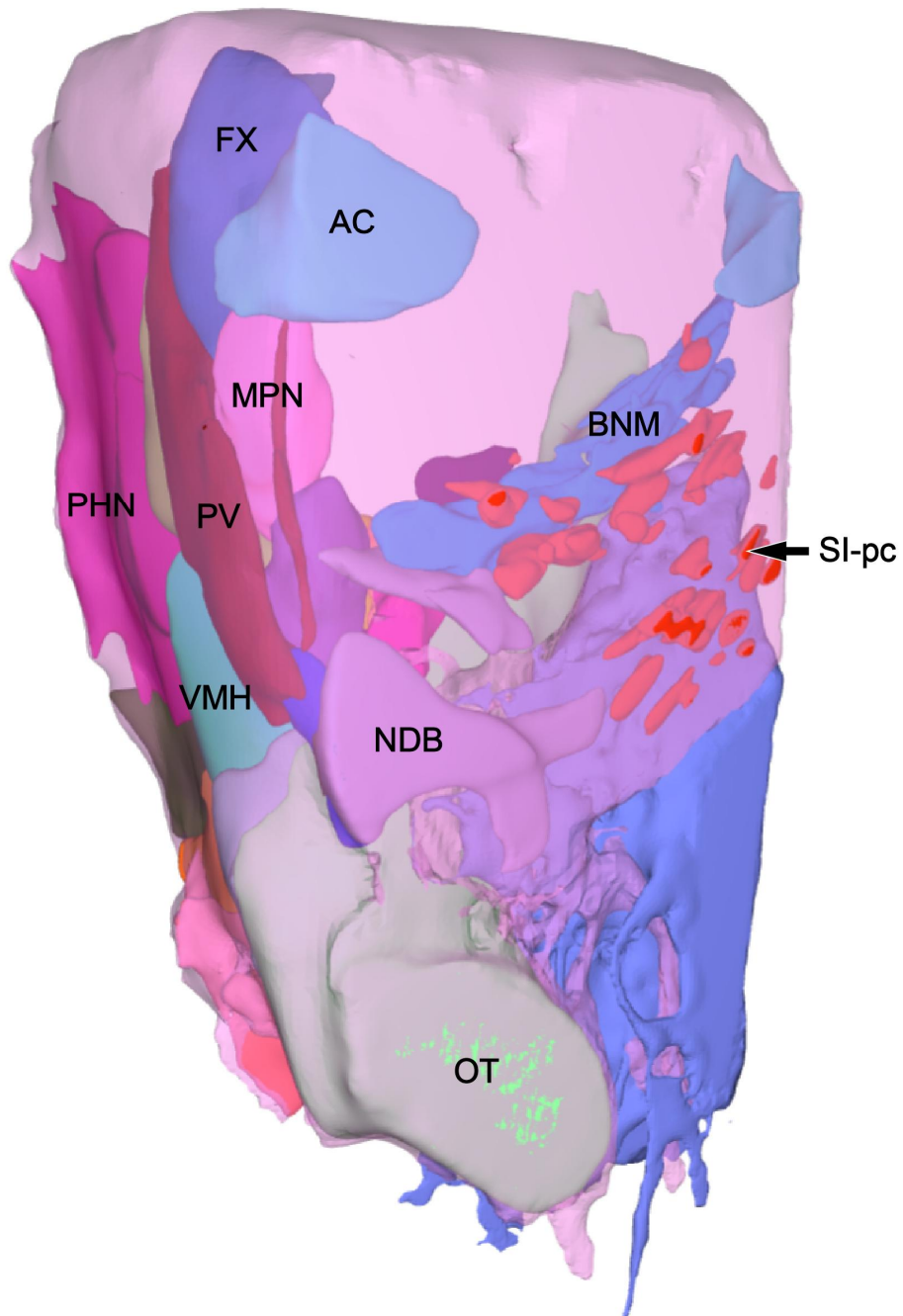
제작한 교육 모델은 WebGL (Web Graphics Library) 주소를 생성하여 교육용 콘텐츠로 제작하였다. WebGL은 플러그인을 사용하지 않고 호환되는 웹 브라우저에서 상호작용이 가능한 2D/3D 그래픽 렌더링 자바스크립트 라이브러리이다. 이를 이용하여 개인 디바이스를 통해 접속할 수 있는 u러닝 (Ubiquitous Learning) 교육자료를 제작하였다[그림 29]. 각 구조물별로 탭을 생성하여 투명도 값을 0~100%까지 10단계로 조절할 수 있도록 하였고 마우스 버튼과 휠을 사용하여 각도 조절 및 확대/축소가 가능하도록 제작하였다.



[그림 28-1] MeshMixer를 이용하여 제작한 사람 시상하부 구조물 3차원 교육 모델. OT, optic tract; RCN, retrochiasmatic nucleus; FX, fornix; MPN, medial preoptic nucleus; AHN, anterior hypothalamic nucleus; SO, supraoptic nucleus; PV, paraventricular nucleus of hypothalamus; PHN, posterior hypothalamic nucleus; VMH, ventromedial hypothalamic nucleus; TM, tuberomammillary nucleus; LT, lateral tuberal nuclei; ARC, arcuate nucleus of hypothalamus; mtt, mammillothalamic tract; MN, mammillary nucleus; AC, anterior commissure; BNM, Basal nucleus of Meynert; DMH, dorsal hypothalamic nucleus; LHsc, accessory secretory cells of lateral hypothalamus; ME, medial eminence; UnN, uncinate nucleus; NDB, nucleus of diagonal band; SCN, suprachiasmatic nucleus.



[그림 28-2] MeshMixer를 이용하여 제작한 사람 시상하부 구조물 3차원 교육 모델. OT, optic tract; RCN, retrochiasmatic nucleus; FX, fornix; MPN, medial preoptic nucleus; SO, supraoptic nucleus; PV, paraventricular nucleus of hypothalamus; PHN, posterior hypothalamic nucleus; mtt, mammillothalamic tract; AC, anterior commissure; BNM, basal nucleus of Meynert; NDB, nucleus of diagonal band.



[그림 29] 완성된 시상하부 3차원 재구성 WebGL 교육 모델. OT, optic tract; FX, fornix; MPN, medial preoptic nucleus; PV, paraventricular nucleus of hypothalamus; PHN, posterior hypothalamic nucleus; mtt, mammillothalamic tract; MN, mammillary nucleus; AC, anterior commissure; BNM, basal nucleus of Meynert; NDB, nucleus of diagonal band.

결 과

1. 사람 시상하부 조직 염색 영상

사람 뇌 시상하부 조직을 대상으로 하여 Nissl staining을 시도하였고 이를 통해 총 100장의 조직 염색 영상을 획득하였다.

2. 사람 시상하부 2차원 지도

염색된 시상하부 조직 영상들을 Allen atlas를 참고하여 총 100장의 2차원 지도로 만들었다. 시상하부 주변 구조물과 핵 분포양상을 포함하는 총 23개의 구역화를 수행하였다. 각 슬라이드에 해당하는 구역화 영상을 총 100장 획득하였다. 염색과정 중 명확한 결과를 얻지 못한 총 11장의 슬라이드를 제외시켰고, 이를 수동 보간법으로 보완하였다.

3. 사람 시상하부 3차원 재구성 부피 모델 및 표면 모델

시상하부 2차원 지도를 이용하여 사람 시상하부를 3차원으로 재구성하였다. MEDIP 소프트웨어를 사용하여 총 두 가지 모델을 제작하였다. 첫 번째는 3차원 재구성 부피 모델로, 모든 voxel이 부피 값을 지

니고 있다. 각 구조물을 어느 각도에서나 돌려볼 수 있고, 잘라서 단면도 함께 확인할 수 있는 모델이다. 두 번째는 3차원 재구성 표면 모델이다. 3차원 재구성 부피 모델의 외곽 면만 재현하는 방식이다. 각 마스크 보이기/감추기 기능을 통해 이웃한 구조물의 위치관계를 볼 수 있다. 3D visualization 탭의 투명도 조절을 통해 앞 구조물과 뒤 구조물을 함께 확인할 수 있다.

4. 사람 시상하부 3차원 재구성 교육 모델

공개소프트웨어 MexhMixer를 사용하여 각 구조물의 계단 현상과 이상점을 보완한 교육용 모델을 획득하였다[그림 29]. 이 모델은 MeshMixer 소프트웨어가 설치된 모든 PC에서 확인이 가능하다.

5. 사람 시상하부 3차원 재구성 WebGL 교육 모델

WebGL 주소를 생성하여 접속 및 학습할 수 있는 웹 기반 시상하부 조직 3차원 재구성 교육모델을 작성하였다. 23개 구조물의 투명도를 10단계로 조절할 수 있으며 배경색의 지정, 회전, 위치이동이 가능하도록 하였다. 개인 모바일 폰, 태블릿, PC를 이용하여 접속이 가능하며 [그림 29] WebGL 주소는 다음과 같다.

<http://147.47.229.147:8080/STLRendering/190408.html>

고 찰

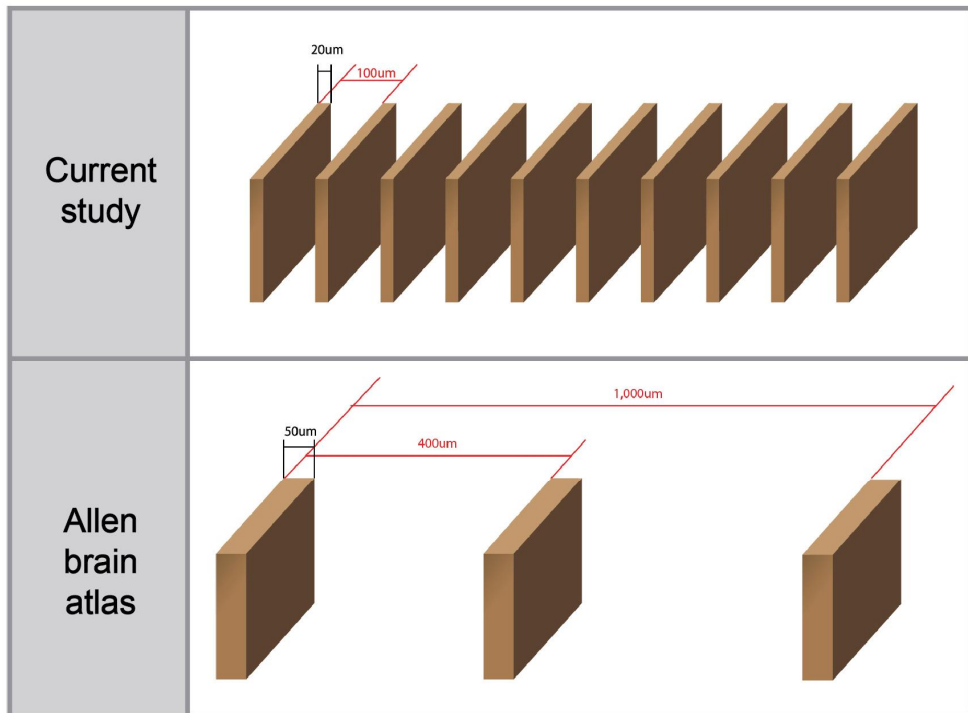
1. Allen brain atlas와의 비교

본 연구에서는 사람 시상하부 조직을 대상으로 하여 조직 염색 이미지의 2차원 지도 및 3차원 재구성 모델을 제작하였다. 이는 사람 시상하부에 대한 최초의 조직영상 기반 3차원 재구성 모델이라는 점에서 의의가 있다.

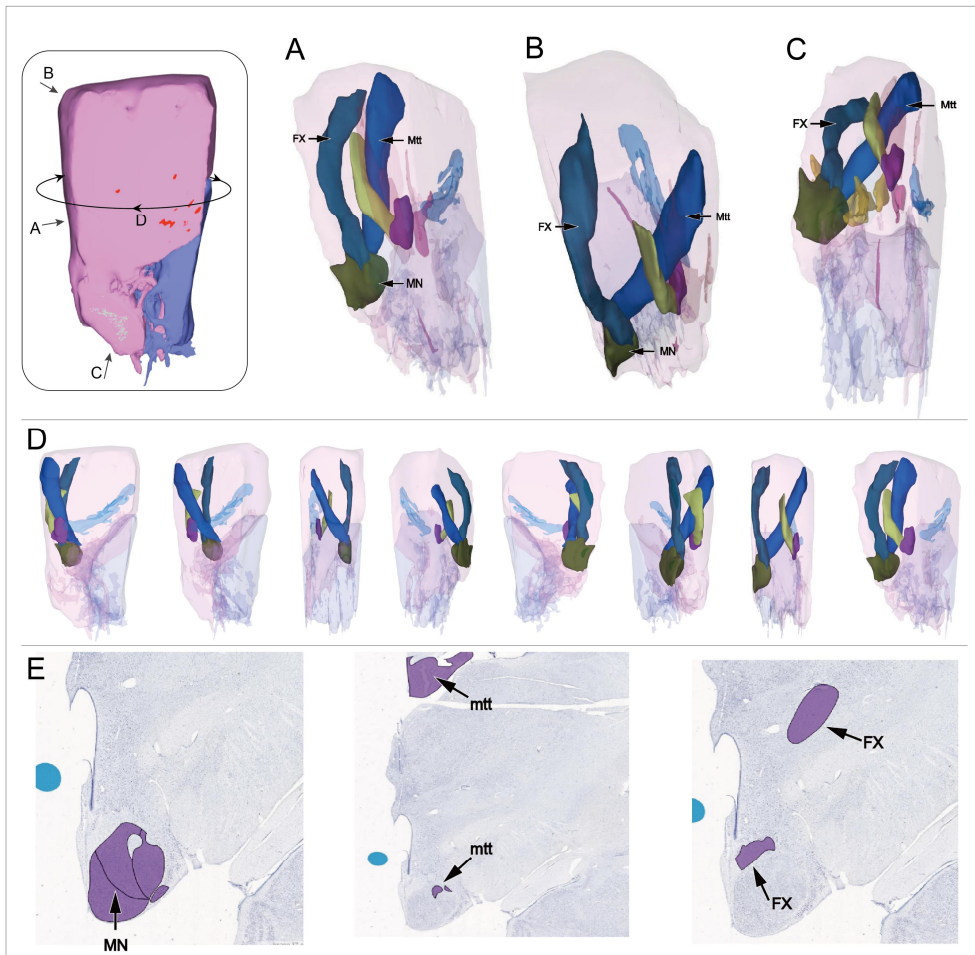
기존에 널리 사용되던 Allen brain atlas는 영상 간격이 0.4–1 mm로 일정하지 않았던 문제가 있었으나 본 연구에서는 일정한 간격으로 염색 결과물을 획득하여 3차원 재구성을 위한 등간격의 기초자료를 제공하고 있다는 점에서 차별성이 있다. 또한 기존 Allen brain atlas는 영상 간격이 평균 1 mm인 반면 본 연구의 조직은 100 μ m의 등간격으로 박절 되어 3차원 재구성에 적합한 높은 해상도 기초자료를 제공하고 있다는 점에서 가치가 있다[그림 30].

본 연구의 사람 시상하부 3차원 재구성 교육모델은 Allen brain atlas가 제공하는 2차원 지도와 비교했을 때 각 미세구조와 신경핵의 위치관계를 공간지각적으로 파악할 수 있도록 해준다는 장점이 있다. 특히 유두핵(mammillary nucleus)과 뇌활 (fornix), 유두시상다발(mammillothalamic tract)의 위치관계는 본 연구의 3차원 재구성 모델이 Allen brain atlas의 2차원 지도보다 보다 직관적인 정보를 제공하는 예시가 될 수 있다. [그림 31]의 조직 염색 슬라이드 내부에 위의 세 구

조물이 구역화 되어 있으나 이는 2차원의 단편적 정보만을 전달하므로 각 구조물의 주행 경로, 전후관계, 연결관계와 같은 공간지각적 정보를 제공하지 못한다. 그러나 본 연구의 3차원 재구성 모델은 위의 세 구조물에 대한 공간지각적 정보를 제공하므로 위치관계를 명확히 파악하는데 용이하다.



[그림 30] 본 연구 뇌 조직과 Allen Brain Atlas 뇌 조직의 두께와 간격 비교. Allen brain atlas에서 제공하는 슬라이드 영상은 뇌 구조물의 특성에 따라 절편이 불규칙하게 선별되었다. 큰 구조물이 다수 포함된 영역은 3.4 mm 간격으로 샘플링 되었고 미세구조물이 다수 포함된 영역은 0.4 mm 간격으로 샘플링 되었다. Allen brain atlas 사람 시상하부 영역은 0.4~1 mm에 해당하는 간격으로 불규칙하게 샘플링 된 반면 본 연구에서 제작한 조직 절편 영상은 100 μm 의 규칙적인 간격으로 샘플링 되었다.

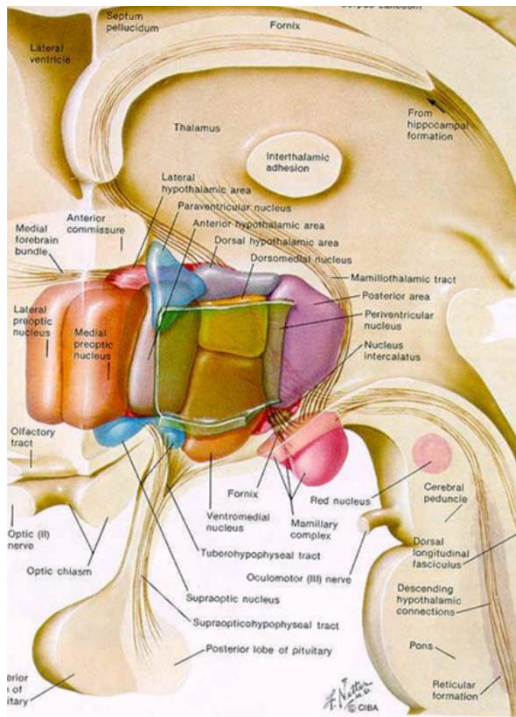


[그림 31] 동일 구조물의 시각화에 대한 Allen brain Atlas와 본 연구의 3차원 재구성 교육모델 비교. A-D: 본 연구의 3차원 재구성 모델의 유두체, 유두시상로, 뇌활을 가장 위쪽 왼쪽 그림에 표시된 방향(A~D)에서 각각 관찰한 모습, E: Allen brain atlas 2차원 지도에서 관찰한 유두핵, 유두시상로, 뇌활의 모습. FX, fornix; mtt, mammillothalamic tract; MN, mammillary nucleus.

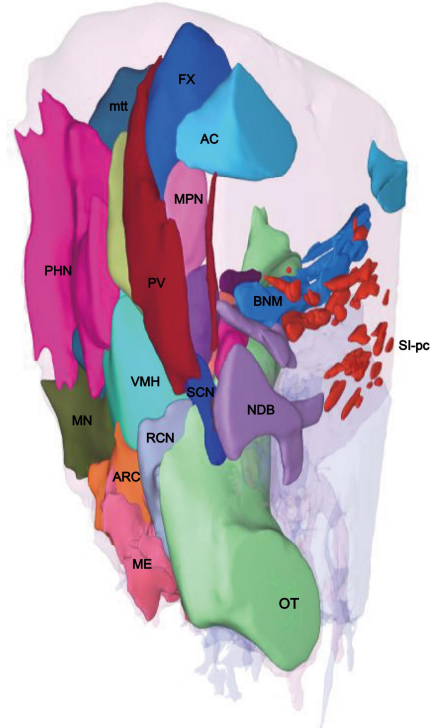
2. MRI 기반 3차원 재구성 모델과의 비교

기존의 사람 시상하부 3차원 재구성 모델은 MRI 데이터를 기반으로 제작되어 구현할 수 있는 미세구조의 수가 많지 않다는 점에서 한계가 있다. Markis 등 (2013)의 연구에서 재구성한 3차원 사람 시상하부 모델은 살아있는 사람의 시상하부를 촬영한 1.5 T MRI 데이터와 시신의 시상하부 조직을 7 T MRI 촬영한 영상을 사용, 조직 염색 영상과 비교하며 구역화와 3차원 재구성을 시도하였다. 한편 위 연구에 사용된 살아있는 사람 1.5 T MRI 영상은 화면 흐림 현상으로 인해 신경핵과 미세구조의 분포 양상을 구분하기 쉽지 않으며 시신을 대상으로 한 7 T MRI 영상은 시각로, 셋째 뇌실, 앞맞교차와 같이 육안 구분이 명확한 구조물에 대한 정보만을 제공하고 있으며 신경핵과 같은 세부 정보는 제공하고 있지 않다. Lemaire 등(2014)의 연구에서도 1.5 T로 촬영한 Inversion Recovery sequence 영상은 사람 시상 하부 미세구조에 대한 10개의 구조물만을 3차원 재구성하여 제공하고 있다. 반면 본 연구에서는 사람 시상하부를 염색한 조직 영상을 이용하여 구역화를 진행하였으므로 총 23개의 구조물을 구분할 수 있었다. 또한 이를 3차원 재구성하여 기존의 MRI 기반의 3차원 지도가 제공하지 못하는 세부적인 신경핵의 위치정보를 제공한다는 점에서 가치가 있다.

A



B



[그림 32] 기존의 2차원 사람 시상하부 교육자료와 본 연구의 3차원 사람 시상하부 교육자료 비교. A: Frank Netter가 제작한 2차원 일러스트레이션, B: 본 연구에서 제작한 3차원 교육모델. OT, optic tract; FX, fornix; MPN, medial preoptic nucleus; PV, paraventricular nucleus of hypothalamus; PHN, posterior hypothalamic nucleus; mtt, mammillothalamic tract; MN, mammillary nucleus; AC, anterior commissure; BNM, basal nucleus of Meynert; NDB, nucleus of diagonal band.

3. 기존 신경조직학 교육자료과 비교 및 교육학적 접목 시도

연구자 혹은 의료인들을 위한 기존의 사람 시상하부 교육자료는 2차원 삽화가 대부분이었던 반면 본 연구에서 제작한 3차원 재구성 모델은 구조물들의 위치관계를 공간지각적으로 파악하는 데 보다 용이하다[그림 32]. 특히 사람 시상하부 부위는 신경핵 및 구조물을 3차원 재구성 모델로 제시한 사례가 전무하므로 본 연구의 교육모델은 많은 시상하부 연구자들에게 도움을 줄 수 있다.

본 연구는 사람 시상하부에 대한 단일 염색법만을 적용하여 구조물의 정보를 얻는 것에 한계가 있었다는 점에서 추가적인 연구가 필요하다. 이는 추후 면역 염색 및 형광염색을 통해 보다 세분화되고 정밀한 이미징을 시도하여 보완하고자 한다.

결 론

이 연구를 통해 조직 탐색 영상의 3차원 재구성 모델을 제작하는 protocol을 개발하였다. 본 연구는 장비와 기술의 한계로 제한적인 소수 연구자들에 의해서만 이루어져 왔던 조직 3차원 재구성을 보다 많은 연구자들이 수행할 수 있도록 진입장벽을 낮추었다는 데 의의가 있다.

또한 본 연구에서는 사람 시상하부 조직을 대상으로, 수립한 protocol에 따라 시상하부의 조직 3차원 재구성모델을 제작하였다. 이들 3차원 재구성 모델은 조직학 영상 기반의 최초 3차원 사람 시상하부 모델이라는 점에서 가치가 있으며, 미세구조물의 위치 관계를 공간지각적으로 파악하는데 매우 유용하였다. 더 나아가 이들 모델을 교육 모델로 변환하여 의료인의 신경해부학 기초 교육 자료로 활용될 수 있도록 하였다.

참 고 문 헌

- 박성익, 장선영, 김미경. 2008. ‘U-러닝’의 이론적 탐색과 실천적 발전과제 분석. 아시아아교육연구 9(1): 149-173.
- 조일현 외. 2006. 유비쿼터스 기반 차세대 학습 모델 개발, 미래교육 혁신 연구 종합발표 보고서. 한국교육학술정보원.
- Amunts K, Lenzen M, Friederici AD, Schleicher A, Morosan P, Palomero-Gallagher N, Zilles K. 2010. Broca's region: novel organizational principles and multiple receptor mapping. PLoS Biology 8: 9.
- Baroncini M, Jissendi P, Catteau-Jonard S, Dewailly D, Pruvo JP, Francke JP, Prevot V. 2010. Sex steroid hormones-related structural plasticity in the human hypothalamus. Neuroimage 50: 428-433.
- Baroncini M, Jissendi P, Balland E, Besson P, Pruvo JP, Francke JP, Dewailly D, Blond S, Prevot V. 2012. MRI atlas of the human hypothalamus. Neuroimage 59: 168-180.
- Caspers S, Eickhoff SB, Zilles K, Amunts K. 2013a. Microstructural grey matter parcellation and its relevance for connectome analyses. NeuroImage 80: 18-26.
- Caspers S, Schleicher A, Bacha-Trams M, Palomero-Gallagher N,

- Amunts K, Zilles K. 2013b. Organization of the human inferior parietal lobule based on receptor architectonics. *Cerebral Cortex* 23: 615– 628.
- Ding SL, Hoesen GW, Cassell MD, Poremba A. 2009. Parcellation of human temporal polar cortex: a combined analysis of multiple cytoarchitectonic, chemoarchitectonic, and pathological markers. *Journal of Comparative Neurology* 514: 595– 623.
- Ding SL, Royall JJ, Sunkin SM, Ng L, Facer BA, Lesnar P, Guillozet-Bongaarts A, McMurray B, Szafer A, Dolbeare TA, Stevens A, Tirrell L, Benner T, Caldejon S, Dalley RA, Dee N, Lau C, Nyhus J, Reding M, Riley ZL, Sandman D, Shen E, van der Kouwe A, Varjabedian A, Wright M, Zöllei L, Dang C, Knowles JA, Koch C, Phillips JW, Sestan N, Wahnoutka P, Zielke HR, Hohmann JG, Jones AR, Bernard A, Hawrylycz MJ, Hof PR, Fischl B, Lein ES. 2016. Comprehensive Cellular-Resolution Atlas of the Adult Human Brain. *The Journal of Comparative Neurology* 524(16): 3127–3481.
- Ghaznavi F, Evans A, Madabhushi A, Feldman M. 2013. Digital imaging in pathology: whole-slide imaging and beyond. *Annual Review of Pathology* 8: 331–359.
- Griffin J, Treanor D. 2017. Digital pathology in clinical use: where are we now and what is holding us back?, *Histopathology* 70: 134–

145.

Hashimoto N, Bautista PA, Haneishi H, Snuderl M, Yagi Y. 2016. Development of a 2D Image Reconstruction and Viewing System for Histological Images from Multiple Tissue Blocks: Towards High-Resolution Whole-Organ 3D Histological Images.

Kartasalo K, Latonen L, Vihinen J, Visakorpi T, Nykter M, Ruusuvaori P. 2018. Comparative analysis of tissue reconstruction algorithms for 3D histology. *Bioinformatics* 34(17): 3013–3021.

Ledford H. 2017. Cell atlases race to map the body. *Nature* 542: 404–405.

Makris N, Swaab DF, van der Kouwe A, Abbs B, Boriel D, Handa RJ, Tobet S, Goldstein JM. 2013. Volumetric Parcellation Methodology of the Human Hypothalamus in Neuroimaging: Normative Data and Sex Differences. *Neuroimage* 69: 1–10.

Magee D, Song Y, Gilbert S, Roberts N, Wijayathunga N, Wilcox R, Bulpitt A, Treanor D. 2015. Histopathology in 3D: from three-dimensional reconstruction to multi-stain and multi-modal analysis. *Journal of Pathology Informatics* 6: 6.

Onozato ML, Klepeis VE, Yagi Y, Mino-Kenudson M. 2012. A role of three-dimensional (3D)-reconstruction in the classification of lung adenocarcinoma. *Analytical Cellular Pathology* 35: 79–84.

Onozato ML, Hammond S, Merren M, Yagi Y. 2013. Evaluation of a

- completely automated tissue-sectioning machine for paraffin blocks. *Journal of Clinical Pathology* 66: 151–154.
- Park J S, Chung M S, Hwang S B, Lee Y S, Har D H, Park H S. 2005. Visible Korean human: improved serially sectioned images of the entire body. *IEEE Trans Med Imaging* 24: 352–360.
- Pascual B, Masdeu JC, Hollenbeck M, Makris N, Insausti R, Ding SL, Dickerson BC. 2015. Large-scale brain networks of the human left temporal pole: a functional connectivity MRI study. *Cerebral Cortex* 25: 680–702. *Pathobiology* 83(2–3): 127–139.
- Roberts N, Magee D, Song Y, Brabazon K, Shires M, Crellin D, Orsi NM, Quirke R, Quirke P, Treanor D. 2012. Toward routine use of 3D histopathology as a research tool. *The American Journal of Pathology* 180: 1835–1842.
- Saper CB, Chou TC, Elmquist JK. 2002. The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron* 36: 199–211.
- Siewerdsen J H. 2011. Cone-Beam CT with a flat-panel detector: from image science to image-guided surgery. *Nucl Instrum Methods Phys Res A* 648: S 241–S50.
- Song WC, Hu KS, Kim HJ, Koh KS. 2007. A study of the secretion mechanism of the sebaceous gland using three-dimensional reconstruction to examine the morphological relationship between the sebaceous gland and arrector pili muscle in the

follicular unit. *Dermatol* 157: 877–889.

Studer D, Humbel B M, Matthias C. 2008. Electron microscopy of high pressure frozen samples: bridging the gap between cellular ultrastructure and atomic resolution. *Histochem Cell Biology* 130: 877–889.

Swaab, DF. 2003. The Human Hypothalamus: Basic and Clinical Aspects. Part I: Nuclei of the Human Hypothalamus. *Handb. Clinical Neurology* 79: 476.

Swaab, DF. 2004. The Human Hypothalamus: Basic and Clinical Aspects. Part II: Neuropathology of the Human Hypothalamus and Adjacent Brain Structures. *Handbook of Clinical Neurology* 80: 597.

Swanson LW. 2000. Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain Research* 886: 113–164.

Abstract

Development of microstructural segmentation and 3D reconstruction method using serial section of tissue: Human hypothalamus 3D educational model

Sun Joo Kim

Department of Anatomy & Cell Biology

College of Medicine

The Graduate School

Seoul National University

INTRODUCTION: The 3D reconstruction technique of tissue staining images is very valuable in that it visualizes the microstructure information that Magnetic resonance imaging (MRI) and Computed tomography (CT) data cannot provide and is widely used for pathological diagnosis. Organizational 3D reconstruction needs the latest devices and software for each phase. However, in reality, it is not easy to equip all of the most brand-new equipment, and software, so the existing research has been done by only a

limited number of people. For this reason, in this study, we tried to develop a 3D reconstruction method of the organization by using available laboratory equipment and highly accessible software.

The human hypothalamus is relatively small compared to other brain structures, but it is the backbone of homeostasis regulation and an important structure directly linked to survival. It consists of more than 13 nuclei and microstructures, and many attempts have been made to identify them. However, most reported histology images were based on the 2D map, that cause researchers are experiencing difficulties in understanding spatial structure perception. In addition, most of the currently reported hypothalamic 3D maps are based on MRI data. This DICOM based medical image has the disadvantage that it is difficult to understand the detailed microstructure of the nucleus. In order to overcome these drawbacks, this study aims to develop a detailed 3D model of the human hypothalamus by using easily accessible devices and software. Since the 3D map of the human hypothalamus has not been reported so far, we have developed a method that allows a wider range of researchers to perform the 3D reconstruction of the tissue, which had previously been done by a limited number of people. We also tried to make the model created by the researchers easily accessible to the field.

Methods: Nissl staining of human brain hypothalamus obtained by autopsy was converted to a digital image using a tissue slide scanner. The whole slide image was converted by using image processing software to adjust the resolution and extension. After that, segmentation of the hypothalamic microstructure was performed in the Adobe Photoshop software, and the missing slide images were prepared by manual interpolation. All the structure segmented images were transformed into black and white to produce a mask suitable for 3D reconstruction, and they were classified by structure. Then, the whole image was subjected to bit number correction and extension conversion suitable for 3D reconstruction using ImageJ software. Then 3D reconstruction software reconstructs the segmented structures into three dimensions and attempts 3D rendering. After transforming them into STL extensions, we tried to edit them using MeshMixer software. Through this process, 3D map was created with WebGL, and the 3D map education model of human hypothesis was created.

Results: A total of 100 staining images were obtained by Nissl staining using human brain hypothalamus. To make our results more clearly, hypothalamic 2D maps obtained in this study were

compared with Allen atlas. A total of 23 segmentations were carried out including hypothalamic surrounding structures and nucleus distribution patterns. A total of 11 excluded slides were supplemented by manual interpolation. The hypothalamus 2D map was used to reconstruct the human hypothalamus as a 3D reconstructed volume model and a 3D reconstructed surface model. The 3D reconstruction surface model was obtained by using MeshMixer to complement the smoothing and the outlier point of each structure. Then, I created a hypothalamus 3D reconstruction education model using WebGL service to make possible for anyone to easily access and learn without the constraint of time and space.

Discussion: In this study, I developed a method for producing 2D map and 3D reconstructed images of Nissl stained using hypothalamus tissue. This is the first 3D reconstruction model based on the hypothalamus, which is meant to help other researchers and medical personnel in education and research. Previous studies have shown that the spacing of the slices of the hypothalamus tissue was not constant, but this study succeeded in acquiring the results of the staining of the hypothalamus tissue at 100 μm intervals as the basic data for 3D reconstruction. Many other types of missing images were found due to the lack of

consideration of various variables that occurred during the reconstruction process. The anatomical structure and various parameters were considered and corrected for more satisfactory results. In addition, existing image-based software provides automatic segmentation function considering only the distinctive features of shaded images, so it is very inappropriate to classify subtle clustering patterns such as nucleus and structures in the human hypothalamus. It is significant that the progress process is segmented, and the separate software suitable for each process is applied, and the process of working with them is compatible with each other. Most software is free, low cost and easy to learn and use, so it provides a way to easily create an organization 3D image without expensive software or equipment. The existing hypothalamus training data were mostly 2D illustrations, but the 3D reconstructed images produced in this study are easy to grasp the positional relationship of structures more space. In particular, since the hypothalamus does not contain data showing nuclear reconstruction as a 3D reconstructed image, the educational model of this study will be of great help to many hypothalamus researchers. And the 3D WebGL education model has pedagogical value because it enables free access and access through user's personal device, enabling ubiquitous learning that is not restricted

by time and space.

Conclusions: Through this study, I have established a method for producing 2D map and 3D reconstruction using human hypothalamus. Through the 3D reconstruction image and the education model, the positional relation of the human hypothalamus can be recognized by spatial perception. This result is pedagogically worthy because it can be used as U-learning material to help researchers self-directed learning by opening it to open source WebGL for easy use by anyone.

Keywords: Hypothalamus, 3D, Reconstruction, Nucleus, Human, Brain, Ubiquitous learning

Student Number: 2016-21894